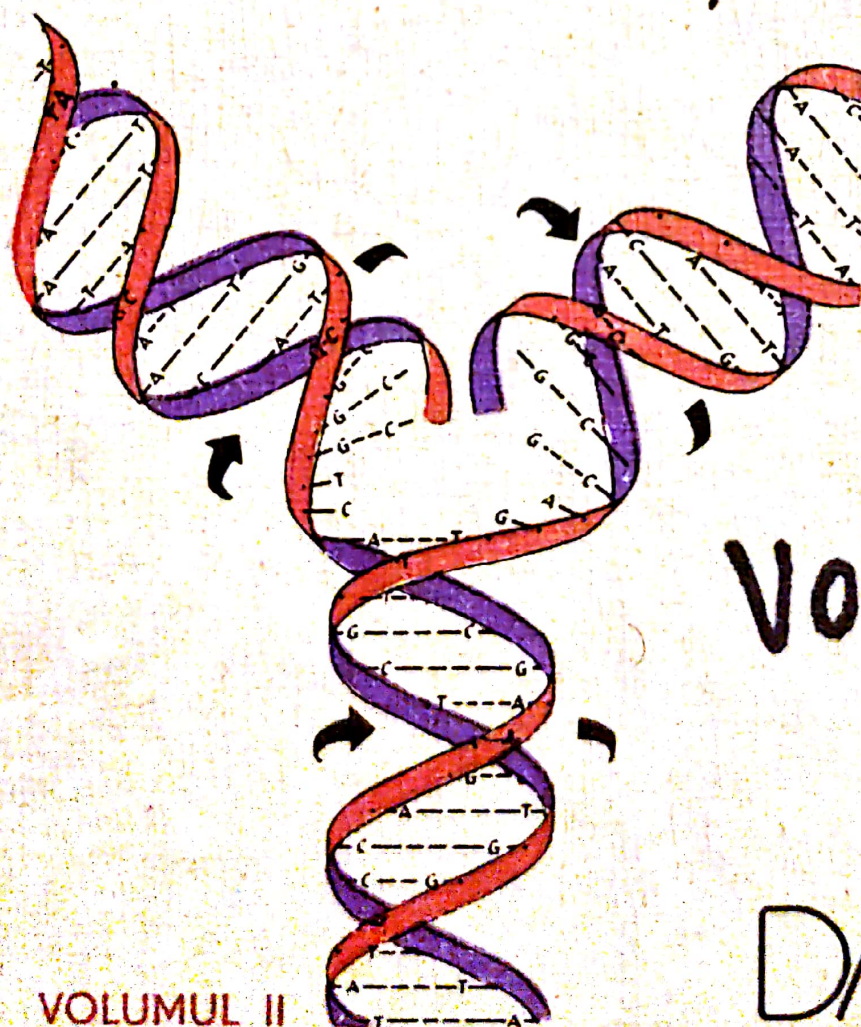


LUCIAN IOAN
GAVRILĂ DĂBALĂ

DESCIFRIND CAINELE EREDITĂȚII



VOL 2

VOLUMUL II

DACIA

LUCIAN GAVRILĂ • IOAN DĂBALĂ

**DESCIFRÎND TAINELE
EREDITĂȚII**

VOL. II

**EDITURA DACIA
CLUJ-NAPOCA 1981**



CUPRINS

CAP. VI.	Mecanismul ereditar la nivel celular (Citogenetica)	7
1.	<i>Introducere</i>	7
2.	<i>Plasarea liniară a genelor pe cromozomi și evidențierea lincajului genic</i>	9
3.	<i>Determinismul sexului</i>	13
4.	<i>Sexlincajul</i>	21
5.	<i>Evidențierea schimbului reciproc de gene (crossing-over)</i>	22
6.	<i>Crossing-overul somatic</i>	34
7.	<i>Crossing-overul inegal</i>	36
8.	<i>Factorii care afectează crossing-overul</i>	37
CAP. VII.	Ereditate extranucleară	42
1.	<i>Definirea eredității extranucleare</i>	42
2.	<i>Substratul fizic al eredității extranucleare</i>	44
3.	<i>Cazuri de ereditate extranucleară</i>	44
3.1.	<i>Ereditate nucleară cu efect întârziat</i>	44
3.2.	<i>Ereditate extranucleară bazată pe gene plastidiale.</i>	46
3.3.	<i>Ereditate extracromozomală bazată pe gene mitocondriale</i>	47
3.4.	<i>Androsterilitatea</i>	49
3.5.	<i>Ereditate endosimbiotică</i>	51
3.6.	<i>Sex-ratio matern și sensibilitatea la CO₂ la Drosophila.</i>	53
CAP. VIII.	Reglarea activității genice	55
1.	<i>Introducere</i>	55
2.	<i>Reglarea activității genice la procariote</i>	58
3.	<i>Reglarea operonului lac la E. coli</i>	63
3.1.	<i>Aspecte genetice ale reglării operonului lac</i>	63
3.2.	<i>Demonstrarea realității represorului lac (produsul genei lac i⁺)</i>	67
4.	<i>Represia catabolică</i>	70
5.	<i>Sisteme represibile la bacterii</i>	74
6.	<i>Inhibiție prin feedback</i>	77
7.	<i>Reglarea sintezei proteinice prin modulare</i>	79
8.	<i>Replicarea ADN și transcrierea</i>	79
9.	<i>Răspunsul stringent</i>	81
10.	<i>Reglarea activității genice la eucariote</i>	83
10.1.	<i>Aspecte generale ale reglării genice la eucariote</i>	83
10.2.	<i>Reglaj pe termen scurt și reglaj pe termen lung</i>	84

	10.3. Reglarea la nivelul transcrierii genetice la eucariote	85
	10.4. Reglarea genetică pe termen lung	93
	10.5. Bazele genetice ale reglării de lungă durată	100
	10.6. Elementele transpozabile și reglarea activității genice	104
	10.7. Reglarea distribuirii genelor în cursul diviziunii celulare	105
CAP. IX	Proces mutagen și recombinare genetică	109
	I PROCES MUTAGEN	
	1. Generalități	109
	2. Agenți mutageni	115
	2.1. Agenți mutageni fizici	115
	2.2. Agenți mutageni chimici	116
	2.3. Agenți mutageni biologici	119
	3. Tipuri de mutații	119
	3.1. Mutația genică	119
	3.1.1. Tranziția	121
	3.1.2. Transversia	121
	3.1.3. Adiția, deleția și reversia	123
	3.1.4. Mutații de același sens (Same sense M.)	125
	3.1.5. Mutație de sens greșit (Missense M.)	125
	3.1.6. Mutația nonsens	126
	3.1.7. Revertanții mutației nonsens	126
	3.1.8. Mutația supresoare	128
	3.1.9. Mutații silențioase	129
	3.2. Mutații structural-cromozomale	129
	3.3. Mutații numeric cromozomale	131
	4. Mutația și funcția proteinelor	133
	5. Gene mutabile și paramutabile	136
	6. Paramutația	136
	II. RECOMBINARE GENETICĂ	
	1. Generalități privind recombinarea	137
	2. Conversia genică	146
CAP. X.	Imunogenetică	149
	1. Generalități	149
	2. Imunogenetică umană	152
	3. Genele pentru imunoglobuline	155
	4. Interferență și interferon	164
CAP. XI.	Ereditatea comportamentului inteligenței și memoriei	167
	1. Comportamentul și determinismul său genetic	167
	2. Determinismul genetic al inteligenței	171
	3. Învățarea și memoria	175
CAP. XII.	Inginerie genetică	178
	1. Generalități	178
	2. Sinteza artificială a genei	180
	3. Izolarea genei	182
	4. Transferul de gene	188
	5. Transferul de gene în celula eucariotă	198
	Bibliografie selectivă	204

Capitolul VI

MECANISMUL EREDITAR LA NIVEL CELULAR (CITOGENETICA)

Motto 1:

„Mitoza este totdeauna o punte între trecut și viitor“

(C. D. Darlington, 1960)

Motto 2:

„Precum istoria Pământului este înscrisă în straturile sale geologice, tot astfel istoria unui organism este înscrisă în cromozomii săi“

H. Kihara.

1. INTRODUCERE

Pe baza cercetărilor efectuate la lăcusta *Brachystola magna*, Sutton în 1903 aduce prima dovadă a localizării factorilor ereditari mendelieni pe cromozomi. La această lăcustă, fiecare cromozom este distinct și-și păstrează individualitatea morfologică de-a lungul diviziunilor celulare succesive, iar în diviziunea meiotică are loc o împerechere strictă între homologii de origine maternă și cei de origine paternă. Acest lucru fusese sugerat mai înainte de către Montgomery, la 42 specii de insecte hemiptere. Sutton a fost însă primul care a atras atenția asupra asemănării în separarea (disjuncția) cromozomilor omologi în meioză și separarea caracterelor alelomorfe la formarea gameților.

Considerînd un caz ipotetic al unei specii cu 6 cromozomi dispuși în perechi de omologi și admitînd că pe fiecare cromozom se află doar un singur factor ereditar, are loc disjuncția independentă a cromozomilor de origine maternă sau paternă rezultînd 8 tipuri de gameți cu constelații diferite de factori ereditari (ABC , abc , AbC , ABc , ABc , abC , aBC și Abc) în care intră 0, 1, 2 sau 3 cromozomi de origine maternă respectiv 3, 2, 1 sau 0 cromozomi de origine paternă (fig. 54).

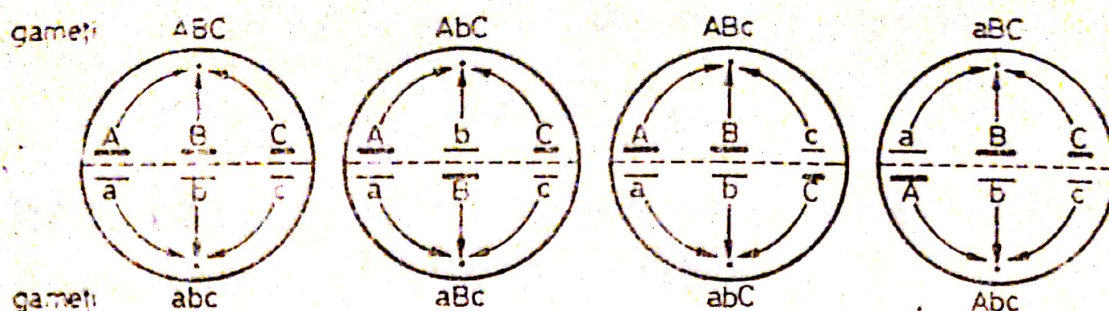


Fig. 54. Disjuncția independentă a perechilor de cromozomi (recombinarea genetică intercromozomală).

Numărul total al combinațiilor este de 2^n în care n reprezintă numărul de cromozomi din setul haploid.

Disjuncția independentă a perechilor de cromozomi este de fapt o consecință inevitabilă a orientării independente a perechilor de cromozomi (bivalentilor) în placa ecuatorială în metafaza I a meiozei, fapt dovedit în 1913 de către Carothers care a analizat 300 de celule în metafaza I sau anafaza I a meiozei (spermatogenezei) la masculul de *B. magna*, heterozigot pentru o inegalitate în dimensiunea unuia dintre cromozomi care formează o pereche inegală. Cromozomul X ce se poate ușor evidenția se deplasează în întregime la un pol al diviziunii în trecere de la M_1 la A_1 . Perechea inegală de cromozomi migrează diferit: în 146 de celule cromozomul mai mic din perechea inegală migrează spre același pol cu cromozomul X, pe cînd în 154 celule cromozomul mai mare din această pereche inegală migrează spre același pol spre care migrează cromozomul X.

Dovezi suplimentare ce sprijineau teza localizării factorilor ereditari mendelieni vin din cercetările referitoare la determinarea sexului. În 1891, Henking a studiat spermatogeneza la insecta hemipteră *Pyrrhocoris apterus*. El a remarcat un corp intens colorat care în fiecare anafază a celei de-a doua diviziuni meiotice (A_{II}) trece spre un pol încît jumătate din spermatozoizi primesc acest corpuscul pe cînd cealaltă jumătate nu primesc. Acest corpuscul despre a cărei natură nu se știa nimic a fost notat cu X.

În 1902, Mc Clung a emis ipoteza că acest comportament meiotic al corpusculului X amintit este implicat în determinarea sexului. Acest corpuscul X a fost omologat cu cromozomul X și legat de determinarea sexului.

În 1905, Wilson descoperă că la masculul de *Protenor bleifragei* există un singur cromozom X pe cînd femela are doi cromozomi X identici. Masculul are o garnitură de 13 cromozomi în celulele somatice pe cînd femelele au 14 cromozomi. Masculul dă naștere la două tipuri de spermatozoizi cu 6 și cu 7 cromozomi fiind deci heterogametic, pe cînd femela dă naștere în ovogeneză la un singur tip de ovule, cu 7 cromozomi, fiind deci homogametică. Determinismul sexului derivă din această distribuție a cromozomului X în gameții masculi. Astfel, dacă un spermatozoid cu 6 cromozomi fecundează un ovul cu 7 cromozomi rezultă un zigot cu 13 cromozomi care va evolua în mascul. Femelele derivă din fecundarea ovulelor de către spermatozoizii cu 7 cromozomi. Sexul fiind un caracter ereditar devenea o axiomă implicarea cromozomilor în transmiterea caracterelor ereditare.

Sutton a fost primul care în 1903 a formulat teoria cromozomală a eredității mendeliene, scoțînd în evidență faptul că numărul de caractere distincte ale unui organism depășește cu mult numărul de cromozomi, astfel că în același cromozom coexistă mai mulți factori mendelieni. Teoria cromozomală a eredității a fost însă dezvoltată și aprofundată prin cercetările lui Morgan și colaboratorilor săi, efectuate pe *Drosophila melanogaster* și publicate între 1911 și 1919. Introducerea drosofilei în cercetarea eredității a reprezentat un moment hotărîtor în descifrarea eredității la nivel celular.

2. PLASAREA LINIARĂ A GENELOR PE CROMOZOMI ȘI EVIDENȚIEREA LINCAJULUI GENIC

Deoarece s-a constatat că există un număr mai mare de caractere exprimate în fenotip față de numărul de cromozomi din garnitura de cromozomi, chiar dacă s-ar admite că un caracter este determinat de mai multe gene nu s-ar putea argumenta egalitatea număr de gene, număr de cromozomi, număr de caractere. De aceea s-a postulat că mai multe gene sînt localizate pe un același cromozom. Datele de analiză genetică nu puteau să fie interpretate decît admițînd că genele sînt plasate pe cromozom într-o ordine liniară, fiecare genă ocupînd un loc precis bine delimitat numit *locus* (plural *loci*). Astăzi adesea gena — un segment din macromolecula de ADN — este redusă

la locusul pe care-l ocupă pe cromozom. Unele virusuri mici au 3—4 gene pe unicul lor cromozom viral, iar fagul ϕ X 174 are 10 gene*. *E. coli* are circa 3000/6000 de gene, dispuse liniar pe unicul cromozom circular bacterian, iar omul are pe cei 22 de cromozomi autozomi neomologi și cromozomul X din setul haploid cel puțin 10 000 de gene.

Într-o experiență în care s-a încrucișat o femelă de drosofilă care prezenta concomitent două caractere mutante (corp negru și aripi vestigiale) cu un mascul cu corp normal (cenușiu) și aripi normale, Morgan a constatat că, contrar celor așteptate în cazul a două perechi de caractere contrastante — corp negru-corp cenușiu, aripi vestigiale-aripi normale, nu a obținut o segregare de tip mendelian. Descendența unei asemenea încrucișări a fost reprezentată de proporții egale de musculițe cu corp negru și aripi vestigiale și musculițe cu corp normal și aripi normale. Atunci, pentru a explica un asemenea comportament, Morgan a admis că cele două gene care controlează culoarea corpului și forma aripilor sînt plasate pe un același cromozom (fig. 55).

Dacă, pentru a obține a doua generație nu se face o încrucișare între indivizii din F_1 din care ar rezulta o segregare în raport de 3:1 atît pentru perechea de factori ereditari ce se referă la culoarea corpului cît și pentru perechea de factori ereditari ce se referă la forma aripilor, ci se realizează un *back-cross* în care se folosește o femelă dublu-mutantă ($b\ vg/b\ vg$) din generația parentală și un mascul normal dar dublu heterozigot ($b\ vg/++$) din F_1 se poate obține situația din figura 55.

Rezultatele unei asemenea experiențe au arătat că factorii ereditari implicați în determinarea culorii corpului și în determinarea formei aripilor manifestă tendința de a se transmite împreună (înlănțuiți sau lincați) la descendenți. Acest fenomen s-a numit *înlănțuirea sau lincajul genelor* și reprezintă tendința factorilor ereditari plasați pe același cromozom de a se transmite în bloc la descendenți.

Lincajul genic, reprezentînd una dintre tezele importante ale teoriei cromozomale a eredității este opus aparent feno-

* Foarte recent, la fagul ϕ X 174 a fost descoperită încă o genă, gena K, pe lîngă celelalte gene A—J. La acest fag apare un interesant fenomen de acoperire a genelor, necunoscut la eucariote: același segment cromozomal este suportul fizic a două gene; gena B este încadrată în segmentul genei A, iar gena D este încadrată în gena E. Gena K se suprapune parțial cu alte două gene. Fenomenul acoperirii de gene este cunoscut și la alți fagi.

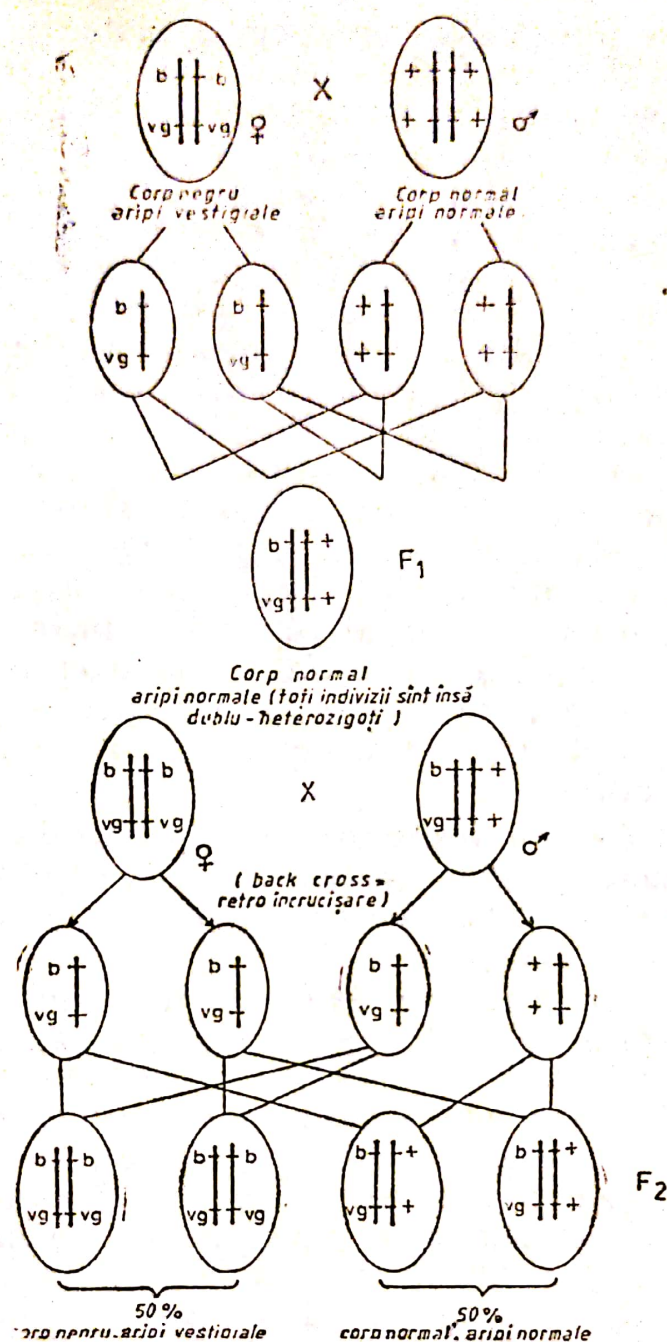


Fig. 55. Înlănțuirea genelor (lincajul).

menului segregării independente a perechilor de factori ereditari postulată de Mendel. Opoziția este într-adevăr numai aparentă, căci segregarea independentă a perechilor de factori ereditari desfășurată în paralel, spațio-temporal cu disjuncția independentă a perechilor de cromozomi omologi în timpul meiozei, se referă la factori ereditari (markeri genetici) plasați pe perechi diferite de cromozomi, pe când lincajul presupune factori ereditari (gene) plasate pe același cromozom.

Studiindu-se lincajul tuturor genelor mutante de la cei peste 500 mutanți de drosofilă s-a constatat că aceștia manifestă tendința de a se grupa în patru grupe. Astfel, o primă grupă cuprinde 141 mutanți, o a doua 228 mutanți, o a treia 156 mutanți și în sfârșit o a patra 12 mutanți.

Existența a patru grupe de lincaj este în mod frapant asemănătoare cu existența a patru grupe la cromozomi în complementul cromozomal de drosofilă. Mai mult, s-a constatat că există o corelație directă între lungimea cromozomilor ce aparțin la o anumită pereche și numărul de mutanți ce se încadrează într-o anumită grupă de lincaj. Astfel perechea II de cromozomi cuprinde cromozomii cei mai mari ai complementului iar grupa II de lincaj cuprinde numărul cel mai mare de mutanți — 228. Perechea a 4-a de cromozomi este reprezentată de cei mai mici cromozomi ai complementului cromozomal și tot astfel, grupa a 4-a de lincaj cuprinde numărul cei mai mici de mutanți. Este logic să fie astfel, căci un cromozom de dimensiune mai mare oferă o bază fizică pentru dispunerea unui număr mai mare de gene comparativ cu un cromozom de dimensiune mai mică.

La procariote există un lincaj total, în sensul că existînd un singur cromozom (genofor) toate genele pe care le posedă genomul celular sînt dispuse pe acest unic cromozom, alcătuiind un singur grup de lincaj.

La organisme eucariote, existența unui număr mai mare de cromozoni face să se diferențieze un număr mai mare de grupe de lincaj. Astfel, la organisme haploide, numărul grupelor de lincaj corespunde la numărul de cromozomi neomologi din setul haploid, o singură dată reprezentați în complementul cromozomal al celulei. La organisme diploide, numărul grupelor de lincaj corespunde la numărul de cromozomi neomologi din setul haploid (din garnitura de bază de cromozomi) și nu la numărul total de cromozomi căci acesta reprezintă dublarea (redundanța) numărului de bază. Astfel, *Chlamydomonas*, care este un eucariot haploid are 16 cromozomi în complementul normal de cromozomi și 16 grupe de lincaj, *Drosophila melanogaster*, care este eucariot diploid are o garnitură diploidă $2n = 8$ cromozomi și 4 grupe de lincaj. *D. pseudoobscura* are $2n = 10$ (5 perechi de cromozomi) și 5 grupe de lincaj, iar porumbul are $2n = 20$ cromozomi (10 perechi de cromozomi) și 10 grupe de lincaj. Aceste date reprezintă un argument suplimentar în sprijinul teoriei cromozomale a eredității. Egalitatea dintre numărul grupelor de lincaj și numărul perechilor

de cromozomi a fost numită de Morgan cea de-a şasea lege a eredităţii.

Markerii genetici care segregă (asortează) independent sînt plasaţi în diferite grupe de lincaj, pe cînd cei care se află în acelaşi grup de lincaj se transmit înlănţuit.

Se poate spune deci că, la formele diploide numărul grupelor de lincaj corespunde la numărul perechilor de cromozomi.

Transmiterea înlănţuită a genelor are importanţă teoretică în alcătuirea hărţilor genetice factoriale şi practică deoarece, în procesul de ameliorare a plantelor şi animalelor ca şi în sfatul genetic se poate aprecia, cunoscînd lincarea genelor, care este posibilitatea transiterii înlănţuite (cotransmiterii) a două gene aflate în strînse raporturi spaţiale, plasate pe acelaşi cromozom. De asemenea în ingineria genetică se poate uşor aprecia transferul eficient al unei gene, cunoscînd raporturile sale de înlănţuire cu alte gene. Bunăoară, gena *nif* care condiţionează sinteza enzimei *nitrogenază* şi implicit capacitatea de fixare a azotului molecular este lincată cu gena histidinei. Transferul genei *nif* poate fi apreciat nu direct prin testul de reducere a acetilenei, ci indirect urmărind transmiterea markerului genetic *his*⁻ — care determină auxotrofia recombinantului pentru histidină. (Zarnea, G. I. Moisa, L. Popa, I. Vătafu, L. Gavrilă, 1979).

3. DETERMINISMUL SEXULUI

Cercetările lui Mc Clung, Wilson, Sutton şi Boveri de la începutul secolului nostru au stabilit că sexul este un caracter ereditar ca oricare alt caracter ereditar şi în determinarea lui intervin anumiţi cromozomi care au fost denumiţi *cromozomi de sex*, gonozomi sau heterozomi spre a-i diferenţia de ceilalţi cromozomi ai complementului cromozomal care s-au numit *autozomi* (A).

S-au stabilit două categorii generale de organisme din punct de vedere al determinismului cromozomal al sexului; organisme cu femele homogametice (care produc ovule de un singur tip) şi masculi heterogameticici (care produc spermatozoizi de două tipuri) şi organisme cu femele heterogametice şi masculi homogameticici. Din prima categorie fac parte organisme la care în determinismul cromozomal al sexului femel intervin doi cromozomi de sex omologi

XX iar în determinismul cromozomal al sexului mascul intervin doi cromozomi de sex neomologi XY. În această categorie se deosebește *subtipul Drosophila* în care pe lângă diptere intră mamiferele (incluzînd omul), unele plante (cînepa, *Bryonia*) etc. și *subtipul Protenor* în care femela este XX iar masculul este XO. Astfel masculul de *Protenor bleifragei* are 13 cromozomi, iar femela are 14 cromozomi. Din a doua categorie fac parte Păsările la care femelele au cromozomii de sex WZ iar masculii au cromozomii de sex ZZ. Tot aici intră și fluturii precum cei din genul *Abraxas*, *Bombyx* etc. Cromozomul W este mai mic comparativ cu Z.

La organisme la care nu s-au diferențiat cromozomii de sex (pești, amfibieni), determinismul sexului este genic, în acest caz, genele care intervin în determinarea sexului fiind distribuite pe diferiți cromozomi ai complementului cromozomal. Diferențierea cromozomilor de sex a reprezentat un moment important al evoluției căci aceasta a condiționat stabilirea unui raport numeric precis între cele două sexe (*sex-ratio*). Speciile la care nu s-au diferențiat cromozomi de sex prezintă o oarecare labilitate a sexului ca atare și implicit a *sex-ratio*-ului.

La mamifere, cromozomul X s-a diferențiat de timpuriu în evoluția lor. Astfel se explică că gena hemofiliei, plasată pe acest cromozom se află atât la cîine și cal cît și la om.

La plantele și animalele hermafrodite același organism dă naștere atât la gameți masculi cît și la gameți femeli, ceea ce înseamnă că același organism poartă informația genetică necesară pentru ambele căi ale diferențierii sexuale. În acest caz același genotip codifică ambele sexe iar mediul determină care din aceste fenotipuri sexuate vor fi exprimate. La melc — *Helix* — care este hermafrodit există o gonadă care produce atât ovule cît și spermatozoizi din celule care uneori sînt foarte apropiate. La rîmă ovulele și spermatozoizii sînt produși în gonade separate, localizate în segmente diferite ale corpului. La unele muscinee (*Bryophyta*) gameții masculi și cei femeli sînt produși în organe sexuale separate, localizate pe același gametofit haploid.

În toate aceste cazuri gameții de sex opus sînt produși de același genotip (de același organism). Diferențele dintre ovule și spermatozoizi pot avea la bază diferențe în genotipurile haploide la formele dioice nu însă și la cele monoice (porumbul). La mușchi atât individul producător de gameți cît și gameții înșiși sînt haploizi, de unde rezultă că, în acest caz, dife-

rențierea celor două tipuri de gameți nu are la bază diferențe în conținutul de gene.

Se apreciază că la organismele hermafrodite și la cele unisexuat monoice, formarea gameților depinde în primul rând de diferențele în mediul intern. Asemenea diferențe trebuie să existe chiar și între celule care stau în intimă vecinătate (ca la *Helix* sp.) și diferențierea gameților în cadrul țesutului gonadal nu se deosebește în principiu de diferențierea celulelor musculare și a celulelor osoase din aceleași elemente de țesut inițial aflate în intimă vecinătate.

La anelidul marin *Ophryotrocha* cele două sexe sînt reprezentate de indivizi separați, iar tipul de sex este dependent de dimensiunea corpului. Cînd animalul este mic, fie în mod natural deoarece este tînăr, fie că s-a redus dimensiunea prin amputare, produce spermatozoizi, pe cînd atunci cînd animalul este mare produce ovule. În acest caz mediul intern al gonadei se schimbă prin creșterea organismului.

La viermele marin *Bonellia*, sexele separate sînt radical diferite ca aspect și activitate, căci femelele sînt macroscopice, nuciforme avînd o trompă lungă, pe cînd masculii sînt microscopici, au formă ciliată și trăiesc ca paraziți în corpul femelei. Ovulele fecundate crescute în absența femelelor adulte se dezvoltă ca femele. În prezența acestora ca și a unui extract din trompa femelei, ovulele fecundate se dezvoltă ca masculi. Rezultă că în diferențierea sexului la *Bonellia* intervine un mesager chimic produs de femelă și eliminat în mediul extern.

La *Chlamydomonas*, tipul sexual este controlat de o singură pereche de alele, mt^+ și mt^- . La majoritatea organismelor genele esențiale ce intervin în determinarea sexului se află pe perechea de cromozomi de sex. Cîndva cromozomii de sex au fost cromozomi obișnuiți la organismele hermafrodite. În cursul evoluției unul dintre omologi s-a modificat. Uneori modificarea a însemnat deleția și scurtarea acestuia, alteori a presupus heterocromatinizare.

La drosofilă o fecundare în care unul dintre gameții participanți este anormal, duce la nașterea de indivizi XO. Un asemenea individ XO, deși steril, apare cu fenotip de mascul. Indivizii cu 2X și un Y sînt femele normale. Ca urmare, la drosofilă, cromozomul Y nu joacă un rol esențial în determinarea sexului. Rezultă că sexul femel este determinat atunci cînd alături de cele două seturi de autozomi (2A) se află 2 cromozom X adică atunci cînd raportul este $X/AA=1$,

iar sexul mascul este determinat de prezența unui singur cromozom X adică atunci când raportul $X/AA=0,5$.

Cromozomul Y poartă, se pare, doar gena sau genele implicate în producerea spermatozoizilor fertili. Dar la drosofilă s-a descris și un locus care există atât pe cromozomul X cât și pe cromozomul Y. Acesta este locusul *bobbed bristles* (*bb*). Tipul normal *bb*⁺ are perișori lungi. Tipul mutant *bb* are perișori subțiri și scurți. La masculii XYY sau femelele XXY există trei alele *bb* și s-ar aștepta ca perișorii să fie mai scurți și mai subțiri chiar decât la tipul mutant *bb*. Dimpotrivă, în prezența a trei doze ale alelei *bb*, perișorii sînt aproape de mărime normală. Aceasta arată că *bb* funcționează de aceeași manieră ca *bb*⁺ dar ceva mai puțin intens, *bb* fiind o alelă hipomorfă. S-a stabilit că de fapt mutantele *bb* sînt deleții parțiale ale regiunii organizator nucleolare, ele producînd mai puțin ARNr decât tipul normal *bb*⁺. Alela *w*^a, care este X-lincată și care conferă culoarea caisă a ochilor la drosofilă este o alelă hipomorfă comparativ cu alela normală *w*⁺.

Alela *w* de asemenea X-lincată și care condiționează culoarea albă a ochilor la drosofilă este o alelă amorfă. (nu determină sinteza nici unui fel de pigment).

La mamifere, deși formula cromozomilor de sex este asemănătoare celei de la drosofilă femela XX (homogametică, dînd gameți de un singur tip X), iar masculul XY (sexul heterogametic dînd două tipuri de spermatozoizi cu X și respectiv cu Y) în determinismul sexului cromozomul Y joacă însă un rol esențial. Prezența sa determină masculinizarea (transformarea progonadei în testicul), iar absența sa feminizarea (transformarea progonadei în ovar). La om, deși tipul de sex este determinat la fecundare, diferențierea sexului depinde în mare măsură de hormonii de sex. În momentul fecundării zigotii XY devin masculi, iar cei XX devin femeli. În dezvoltarea timpurie totuși, toate organele de sex sau gonadele sînt neutre, ne prezentînd indicii macroscopice că vor deveni testicule sau ovare. Gonada timpurie are două regiuni, un cortex extern și o medulă internă. Pe măsură ce are loc dezvoltarea, cortexul degenerază la embrionii XY și medula formează testiculele. La embrionii XX medula degenerază și cortexul formează ovarul. Din momentul în care aceste gonade s-au diferențiat ele preiau reglarea diferențierii ulterioare a sexului prin intermediul hormonilor pe care îi produc.

Hormonii sexuali direcționează dezvoltarea sau degenerarea diferitelor canale sexuale, formarea organelor genitale și a ca-

racterelor sexuale secundare. Diferențierea sexuală este deci în mare măsură controlată de hormonii de sex, așa încît nu este de mirare că indivizii normali genetic prezintă variații morfologice în ceea ce privește sexul. Fenotipul sexului poate să fie schimbat de variațiile în producția de hormoni.

Cromozomii de sex conțin pe lîngă gene care condiționează formarea sexului și gene care n-au nici o legătură cu diferențierea sexului dar care determină însușiri ce sînt *sex-lincate* (legate de sex). La *Drosophila*, gena dominantă pentru culoarea roșie a ochilor (w^+) de la tipul sălbatic se află pe cromozomul X, fiind deci sex-lincată. În locusul acestei gene, în populația de drosofilă (deci la diferiți indivizi) se află alelele acestei gene care determină diferite nuanțe ale culorii ochilor, alela recesivă absolută fiind alela w care determină culoarea albă a ochilor. Din încrucișarea unei femele cu ochi roșii cu un mascul cu ochi albi (alela w manifestată în stare hemizigotă) rezultă în F_1 musculițe cu ochi roșii. Din împerecherea musculițelor din F_1 rezultă generația F_2 cu femele numai cu ochi roșii și cu masculi $1/2$ cu ochi albi. Dacă nu se ia în considerație sexul, segregarea ochii roșii : ochii albi este de 3 : 1. Din încrucișarea reciprocă (femele cu ochi albi $\times$ masculi cu ochi roșii) se obțin în F_1 femele cu ochi roși precum genitorul patern și masculi cu ochi albi precum genitorul matern. Acest fenomen s-a numit „ereditate în cruce” în care însușirile mamei sînt transmise la descendenți masculi, iar însușirile tatălui la descendenți femele. Această proprietate este specifică caracterelor, respectiv genelor sex-lincate și prezintă deosebit interes în practica ameliorării.

La *Bombyx mori* există o genă mutantă recesivă apărută în urma iradierii care determină apariția culorii negre a ouălor. Această mutantă este importantă practic căci gena fiind recesivă și X-lincată se manifestă la femelele heterogametice (XY) în stare hemizigotă și ouăle femele pot fi eliminate prin triere cu ajutorul unei celule fotoelectrice, femelele fiind mai puțin productive decît masculii.

La păsări, unde femelele sînt heterogametice și masculii homogametici, gena pentru culoarea penajului este sex-lincată. Prin încrucișarea de cocoși vărgați din rasa *Plymouth Rock* cu găini negre (*Langshan*) în F_1 se obțin cocoși și găini vărgate, iar în F_2 cocoși vărgați și găini vărgate și negre. Din încrucișarea reciprocă (găini vărgate $\times$ cocoș negru) rezultă în F_1 găini negre și cocoși vărgați, iar în F_2 cocoși și găini vărgate, cocoși și găini negre. Apare și aici „ereditatea în cruce”. Avicul-

torii, cunoscînd ereditatea culorii penajului la găini vînd puii vîrgați obținuți din încrucișarea cocoșilor negri cu găini vîrgate, căci acești pui sînt cocoși, fiind recunoscuți ca atare după penaj, înainte de a apare caracterele sexuale secundare. Puii negri sînt puicuțe și vor deveni găini ouătoare.

La om, boli grave precum hemofilia, sînt determinate de gene X-lincate manifestînd această ereditate în cruce.

Unele caractere sînt sex-limitate, adică se manifestă doar la unul dintre sexe. De exemplu producerea de lapte la bovine sau producerea de ouă la păsări este caracteristică doar sexului femel deși caracterul de productivitate se poate transmite și prin mascul. Astfel, vacile ce provin din încrucișări în care se folosesc tauri proveniți din vaci ce au o mare productivitate de lapte, vor avea și ele o mare productivitate de lapte. De asemenea alopecia (chelia prematură) este de regulă caracteristică bărbaților, foarte rar apărînd la femei (mai ales în condiții patologice).

Există de asemenea fenomenul de sex-influențare în care un anumit caracter este prezent la ambele sexe, dar la unul dintre ele se manifestă ca dominant, pe cînd la celălalt se manifestă ca recesiv. Sînt rase de oi la care și masculii și femelele au coarne, dar la masculi sînt mai răsucite și mai mari, pe cînd la femele sînt mai mici sau în descendență pot da forme fără coarne. Astfel, pentru mascul acest caracter este dominant, pe cînd la femelă este recesiv.

Se cunosc și cazuri în care la determinismul sexului intervin heterozomi multipli (*Mus minutoides*, *Potorous tridactylis* marsupial), *Humulus lupulus*. De asemenea, în determinismului sexului apar și cazuri aberante. Astfel, le speciile care în mod normal sînt bisexuate, apar pe lîngă sexul mascul și femel și indivizi care întrunesc caractere ale ambelor sexe, din care cauză s-au numit *intersexuați*. Amestecul de caractere masculine și femele are la bază faptul că dezvoltarea începe mai întîi ca un sex și apoi continuă ca celălalt sex. Intersexualitatea a fost descrisă la diferite organisme, printre care fluturele *Lymantria* și porumbei.

De asemenea, prin pierderea în stadiile timpurii ale ontogenezei a unui cromozom de sex se ajunge la nașterea de indivizi *ginandromorfi*, care prezintă pe anumite sectoare ale corpului caracterele femelei, iar pe altele caracterele masculului.

Goldschmidt a elaborat teoria cantitativă a determinării sexului — sistemul echilibrului — confirmată de Bridges la *Drosophila*, după care sexul rezultă în funcție de raportul dintre

factorii ereditari prezenți atât în cromozomul X cât și în autozomi, ceea ce înseamnă că determinarea sexului nu rezidă numai în intervenția exclusivă a cromozomilor X și Y. În urma nondisjunției iau naștere gameți aneuploizi din fecundarea cărora apar indivizi cu diverse sindroame:

- XO — *sindrom Turner* caracterizează femei anormale, sterile,
- XXY — *sindrom Klinefelter* caracterizează bărbați sterili, cu ginecomastie,
- XXX — *sindrom superfemală*, (trisomia X) caracterizează femei anormale fizio-psihic,
- XXXY — bărbați anormali,
- XYY — bărbați normali, fertili cu talie înaltă, predispuși la un comportament antisocial, cu tendințe criminale (fără a fi însă o regulă).

La *Hymenoptera* sexele de obicei diferă prin numărul genomic de cromozomi. Astfel, masculul de albină este haploid, pe când matca și lucrătoarele sînt diploide. Masculul (trîntorul) de albine rezultă din ovule nefecundate (partenogeneză-ginogeneză).

La om *sex-ratio* ar trebui să fie de 1 : 1 după desfășurarea meiozei și unirea gameților în procesul de fecundare pe bază de hazard. Dar factori diferiți, genetici și negenetici fac să se nască în medie 106 băieți la 100 fete. Se admite că cei patru produși ai unei celule meiotice testiculare poartă cromozomii X, X, Y, Y. Există posibilitatea ca în timpul sau după spermiogeneză (conversia celulei telofazice II în spermatozoid) unii spermatozoizi ce au cromozomul X să fie pierduți. Tot astfel, în timpul actului sexual spermatozoizii ce poartă X, fiind mai mari (cromozomul X este mai mare decît cromozomul Y) înnoată mai încet decît cei ce poartă cromozomul Y, fecundînd mai rar ovulele. În ultimul timp în stabilirea *sex-ratio* la om a fost implicat și infecția virală. Astfel, un individ care a avut rujeolă are mai multe șanse de a avea un băiat. De asemenea este implicat în stabilirea *sex-ratio* la om și infecția virală cu virusul hepatitei. Virusul hepatitei sau *antigenul Australia* prezintă o structură imunologică identică celei a spermatozoidului Y. Un om contaminat cu acest antigen fabrică anticorpi care vor distruge atât antigenul Australia cît și spermatozoizii care

poartă cromozomul Y. Ca urmare, la asemenea bărbați, rămân funcționali doar spermatozoizii X care fecundând ovulul vor duce la nașterea unor embrioni de sex femel. La o femeie care a fost contaminată cu virusul hepatitei anticorpilor *anti-Australia* vor distruge embrionul mascul rezultat din fecundarea unui ovul de către spermatozoidul Y dar nu vor avea efect asupra unui embrion femel (Rossion, 1980). S-a mai remarcat că sex-ratio (raportul băieți/fete) la naștere este de 1,067 : 1,000 la părinții tineri și 1,036 : 1,000 la părinții bătrâni. Mamele vîrstnice avortează mai frecvent embrioni masculi. La acestea au loc și pierderi de cromozomi inclusiv de cromozomi de sex. Dacă zigotul este XY și se pierde cromozomul X, o asemenea pierdere este letală, zigotul — un băiat potențial — fiind avortat. Dacă însă cromozomul pierdut este Y, această pierdere nu este letală, și în locul unui băiat se va naște o fetiță, e drept anormală.

De asemenea cu creșterea vîrstei mamei crește și nondisjuncția meiotică care interferă cu modificarea sex-ratio-ului. Nu trebuie exclusă nici posibilitatea ca tații să fie incriminați în schimbarea sex-ratio-ului. Selecția postmeiotică față de spermatozoizii cu cromozomul Y poate crește cu vîrsta tatălui. Pe măsură ce tații înaintază în vîrstă are loc nondisjuncția la nivelul tetradei cu formarea de spermatozoizi cu X, X, YY și O cromozomi de sex. Primele două tipuri de spermatozoizi, cu cromozomul X participînd la fecundarea ovulelor vor duce la nașterea de fete normale. Un spermatozoid cu doi cromozomi Y (YY) va duce la formarea unui embrion mascul care poate fi născut și să fie viabil, dar poate să fie și avortat. Ultimul tip de spermatozoid (O) va produce în urma fecundării cu un ovul normal o fetiță anormală (XO). Dar sînt posibile și alte cauze genetice și negenetice care interferă cu schimbarea raportului dintre sexe. Examinarea numeroaselor pedigree pentru sex-ratio arată existența a numeroase nașteri consecutive ale aceluiași sex. Analizat statistic acest fenomen nu poate fi atribuit numai întîmplării. Bunăoară, o familie a născut băieți în 47 de nașteri, pe cînd alta numai fete în 72 de nașteri. Actualmente nu se cunosc exact bazele științifice ale unor asemenea fenomene la om. Dar, implicarea antigenului Australia în sex-ratio uman și a descoperirii la drosofilă a unui fenomen în care toți spermatozoizii funcționali poartă cromozomul X datorită unei gene numită gena sex-ratio, alături de descoperirea — tot la drosofilă — că femela transmite prin ovule un agent infecțios — *spiroplasma* care omoară embrionii masculi, vin să

arate că și la om sex-ratio poate fi influențat de factori genetici ca și de factori de mediu, ca orice alt caracter ereditar.

La animale, la care se practică fecundarea artificială s-a reușit separarea spermatozoizilor X de spermatozoizii Y prin centrifugare sau în câmp electric. Pe această cale va fi posibilă dirijarea sexului.

4. SEXLINCAJUL

La organismele la care sexul femel este homogametic (XX), iar cel mascul este heterogametic (XY), masculul va transmite cromozomul X numai la fiice iar cromozomul Y numai la fii, pe cînd femela va transmite cromozomul X atît la fiice cît și la fii. Această înseamnă că un mascul va moșteni cromozomul X numai de la mamă. Caracterele determinate de gene localizate pe cromozomul X se transmit în conformitate cu acest model de moștenire a cromozomului X și se spune că sînt sex-lincate.

La om o maladie foarte gravă, *hemofilia*, manifestată prin hemoragii puternice în cazul unor leziuni mici se transmite după un asemenea model fiind *sex-lincată*. Ea este determinată de o genă recesivă *h*, localizată pe cromozomul X. Gena normală *h*⁺ condiționează sinteza unei proteine sanguine numită *globulina antihemofilică* (AHG) necesară pentru formarea *tromboplastinei* care condiționează coagularea sîngelui. În stare recesivă (*h*) această genă nu determină sinteza AHG.

Gena se manifestă la femei homozigote (*X^hX^h*) și la bărbați ori de cîte ori se află pe unicul lor cromozom X, deci în stare hemizigotă (*X^hY*). Gena nu se manifestă la femeile heterozigote (*X^hX*) căci, deși este localizată pe un cromozon X, pe celălalt cromozom omolog X se află alela sa normală (*h*⁺) care este dominantă și condiționează sinteza AHG. Gena hemofiliei în stare homozigotă are cel mai adesea caracter letal, embrionii femeli pot să moară în timpul vieții intrauterine, sau dacă se nasc, mor în primii ani de viață.

Un comportament asemănător are gena daltonismului localizată tot pe cromozomul X dar care, spre deosebire de gena hemofiliei, nu are caracter letal cînd se află în stare homozigotă (*X^hX^h*) astfel că, atît femeile cît și bărbații pot manifesta această maladie — cecitate cromatică — *daltonism*.

Genele plasate pe cromozomii autozomi sînt numite și gene autozomale, pe cînd cele localizate pe cromozomii de sex se numesc gene heterozomale. Stabilirea naturii autozomale sau heterozomale a unei gene se poate realiza numai urmărind comportamentul său atunci cînd este în stare mutantă. Astfel, mutația unei gene autozomale se manifestă în egală măsură la ambele sexe, pe cînd mutația unei gene heterozomale afectează în mod diferențiat cele două sexe.

Ca regulă, genele sex-lincate pot fi decelate prin încrucișări reciproce de tip $ww^{\circ} \times w^{+y} \text{ } \text{♂}$ și $w^{+}w^{+} \times wy \text{ } \text{♂}$ în care indivizii femeli ww' sau masculi wy sînt drosofile cu ochi albi, iar indivizii $w^{+}w^{+}$ sau $w^{+}y$ prezintă culoarea normală a ochilor (roșie). Ori de cîte ori din asemenea încrucișări apar raporturi fenotipice foarte diferite (mutația genei sexlincate afectează diferit cele două sexe) în F_1 și F_2 , caracterul studiat prezintă cea mai mare probabilitate de a fi sexlincat. Într-adevăr, prin asemenea experiențe s-a stabilit că gena w se află localizată pe cromozomul X. La om s-a stabilit că peste 70 de maladii ereditare, unele extrem de grave, sînt sexlincate.

5. EVIDENȚIEREA SCHIMBULUI RECIPROC DE GENE (CROSSING-OVER)

Aceeași experiență prin care s-a evidențiat fenomenul de înlănțuire a genelor poate să ofere și baza experimentală, faptică, pentru descrierea unui alt eveniment genetic ce se petrece în meioză și anume schimbul reciproc de gene între cromozomii omologi.

Cînd, în vederea obținerii generației F_2 se realizează un test cross, adică o încrucișare în care în calitate de genitor matern se folosește o femelă heterozigotă ($b \text{ } vg/+ +$) din F_1 , iar în calitate de genitor patern un mascul (homozigot recesiv) dublu mutant în conformitate cu principiul lincajului, ar fi trebuit să se obțină 50% indivizi dublu-mutanți și 50% indivizi normali dar dublu heterozigoți. Experimental au fost însă obținute alte rezultate și anume: aceste două categorii de indivizi au fost obținute într-adevăr în proporții egale, dar nu în procent de 50% ci numai 41,5% (fig. 56). În plus, au apărut două categorii noi de organisme care prezentau un caracter de la un părinte și celălalt caracter de la celălalt părinte: corp negru — aripi normale (8,5%) și corp normal — aripi vestigiale (8,5%). Acești in-

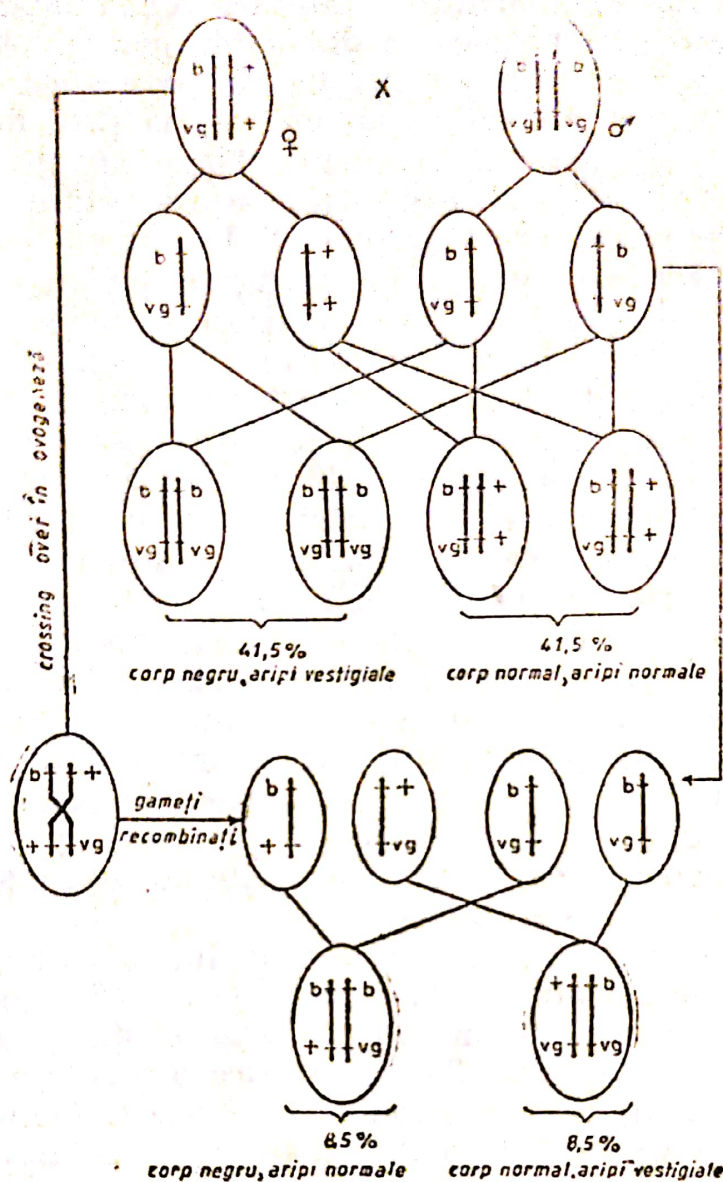


Fig. 56. Recombinare genetică intracromozomală (crossing-over).

divizi prezentau deci caractere recombinante. Din experiențele de dihibridare, Mendel constatasese că poate avea loc recombina-rea de caractere alelomorfe, dar ulterior s-a stabilit că această recombina-re se realizează între caractere controlate de gene plasate pe cromozomi neomologi. În cazul drosofilei și în expe-riența considerată, se stabilise clar că cele două gene mutante b și vg și alelele lor dominante (normale) sînt plasate pe cro-mozomi omologi. Fiind plasate pe același cromozom, ele au manifestat tendința de a se transmite înlănțuit. Dar înlănțui-

rea a fost parțială, apărînd și indivizi recombinanți. Singura explicație plauzibilă pe care a dat-o Morgan privind apariția recombinării genetice între gene plasate pe același cromozom a fost admiterea unui mecanism de schimb reciproc de gene între cromozomi omologi (*crossing-over*) desfășurat în meioza femelelor heterozigote. Astfel, drosfila reprezintă primul organism la care a fost remarcat *crossing-over*ul. În cadrul acestui mecanism, în ovogeneza femelelor heterozigote, pe lângă apariția de ovule nerecombinante, apar și două tipuri de ovule recombinate (recombinarea genetică intracromozomală). Aceste două tipuri de ovule recombinate dau, în urma fecundării cu spermatozoizii obișnuiți cele două categorii de organisme recombinate. Recombinarea de caractere și schimb eficient nu poate avea loc decît între caractere, respectiv gene contrastante, adică doar la organismele heterozigote. Acesta este un fenomen care se opune în parte lincajului (doar 83% dintre descendenți au moștenit genele *b* și *vg* respectiv genele normale *b*⁺ și *vg*⁺ lincate, pe cînd 17% au prezentat abateri de la lincaj) din care cauză inițial *crossing-over*ul a fost numit și lincaj parțial, definit ca a treia lege a eredității, după primele două legi mendeliene, legea segregării și legea disjuncției independente.

Morgan a admis că cu cît genele sînt mai apropiat plasate pe cromozom cu atît ele se pot transmite cu mai mare probabilitate împreună, lincate, la descendenți.

Ulterior Sturtevant, colaboratorul lui Morgan, a propus ca procentul de recombinante (*crossing over*) dintre două gene date să fie folosit ca un indiciu al distanței dintre aceste două gene. Tot el descoperă că distanța dintre o serie de factori lincați a fost aditivă, ceea ce înseamnă că acești factori ar putea fi reprezentați grafic într-o dispunere liniară. Dispunerea liniară a genelor pe cromozomi a fost un argument foarte solid al teoriei cromozomale a eredității, deoarece însuși cromozomul este o structură de forma unei baghete — liniară deci. În 1919 Morgan a definit principiul liniar al ordinii genelor cea de-a patra lege a eredității.

Dovada convingătoare a faptului că schimbul de segmente dintre cromozomii omologi însoțește *crossingover*ul genetic a fost adusă în anul 1931 de către Creighton și Mc Clintock, studiind încrucișarea în cadrul unui soi de porumb heterozigot pentru două caractere genetice determinate de gene localizate pe cromozomul 9 și totodată pentru două caractere cromozomale localizate pe același cromozom. Caracterele genetice au fost: colorarea (*C*) sau necolorarea (*c*) a stratului aleuronic,

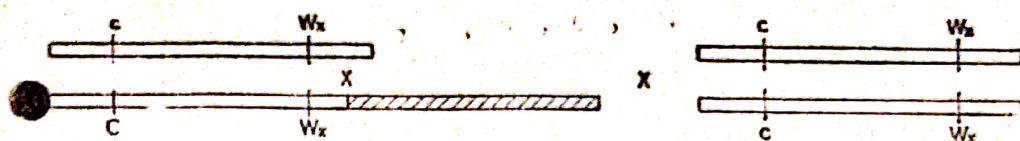


Fig. 57. Evidențierea crossing-overului citologic și crossing-overului genetic la porumb (explicații în text).

cele două gene fiind localizate în apropierea unei îngroșări terminale a cromozomului numită *knob* și endosperm *Starky* (Wx) și endosperm *waxy* (wx).

Cele două caractere cromozomale au fost prezența sau absența *knobului* la capătul brațului scurt și prezența sau absența a unei părți a cromozomului 8 în locul unei părți a brațului lung (fig. 57).

O asemenea plantă cvadruplu-heterozigotă (pentru 2 caractere genetic-factoriale și 2 caractere structural cromozomale) a fost încrucișată cu o plantă normală al cărei cromozom 9 era lipsit de *knob* și de partea translocată a cromozomului 8 și de asemenea era homozigotă pentru gena recesivă c (deci cu aleuronă incoloră) dar heterozigotă $Wx\ wx$ pentru endosperm normal *Starky*. În descendență s-au obținut două plante care, analizate genetic și citologic, prezentau crossing-over între locusul Wx/wx și punctul de atașare a părții translocate de la cromozomul 8. Aceasta a fost prima dovadă a faptului că recombinarea genetică se realizează prin schimbul reciproc dintre cromozomi omologi.

În același timp, Stern a confirmat acest fapt la drosofilă, având la dispoziție patru linii diferite de femele, fiecare heterozigotă pentru anomalii în cromozomul X și pentru două caractere sex-lincate. Astfel, într-o experiență genitorul matern purta, pe unul din cromozomii X , gena recesivă *car* pentru ochi de culoare *carnation* (culoarea garoafei roșii) pe când pe omologul său se afla alela normală (+) și gena dominantă pentru caracterul *Bar* al formei ochilor. Acest cromozom X era însă structural anormal în sensul că avea o parte a cromozomului Y atașată la un capăt, exact înapoia locusului *car* și apoi prezenta o ruptură chiar înapoia locusului *Bar*, segmentul rupt fiind atașat la cromozomul din perechea a patra (IV) (fig. 58A).

Genitorul patern avea cromozomul Y normal structural și alela *car*. Din 823 descendenți au fost examinați citologic 107. La 54 dintre aceștia s-a remarcat existența recombinării genetice (crossing-overului) între locii *car* și *Bar* și fără nici o excepție, examenul citologic a evidențiat existența schimbului

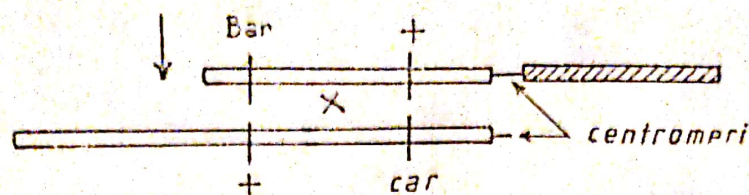


Fig. 58. A. Structura remaniată a cromozomilor X care poartă gena normală (+) pentru culoarea roșie a ochilor și alela sa recesivă *car*, precum și markerul *Bar* (B). Cromozomul de sus prezintă o ruptură înăpoia locusului *Bar* (săgeata) și are atașată o parte a cromozomului Y (zona hașurată).

cromozomal. Indivizii cu ochii barați (*Bar*) aveau culoarea *carnation* dar totodată și cromozomul X fragmentat, pe când cei cu ochi de culoare normală (roșie) prezentau segmentul cromozomului Y atașat la cromozomul lor X (Fig. 58B).

Aceasta a dovedit încă o dată că există o asociere nemijlocită între crossing-overul genetic și schimbul de segmente dintre cromozomii omologi.

Crossing-overul este un eveniment frecvent, care are loc în meioză. Perechile de cromozomi la sfârșitul profazei I a meiozei apar de obicei sub formă de cruce sau sub forma uneia sau a mai multor bucle. În 1909, Janssens a denumit cu termenul *chiasmata* (înseamnă cruce) nodurile dintre brațele sau buclele configurațiilor bivalentilor în diploten sau diachineză.

Müller a emis ideea după care schimbul reciproc de fragmente de cromatide de origine maternă și origine paternă este un proces foarte exact și nu se poate desfășura într-un stadiu precum diplotenul în care cromozomii sînt scurți și groși, ci într-un stadiu mult mai timpuriu cînd cromozomii se află sub forma unor filamente lungi și subțiri, așa cum ar fi în stadiul de zigoten.

Crossing-overul apare în stadiul de 4 cromatice, deci după ce a avut loc duplicarea cromozomală.

Datele cele mai sigure privind stadiul la care apare crossing-overul se obțin prin așa-numita analiza tetradei, prin care se pot analiza fiecare din cei 4 produși meiotici ai unei celule care a suferit meioza. Pentru prima dată analiza tetradei a fost efectuată de Pascher în 1916 la alga verde unicelulară haploidă *Chlamydomonas*.

Dovada genetică cea mai directă bazată pe urmărirea markerilor genetici în cadrul analizei tetradei, după care crossing-overul are loc în stadiul de patru cromatide, a fost adusă de

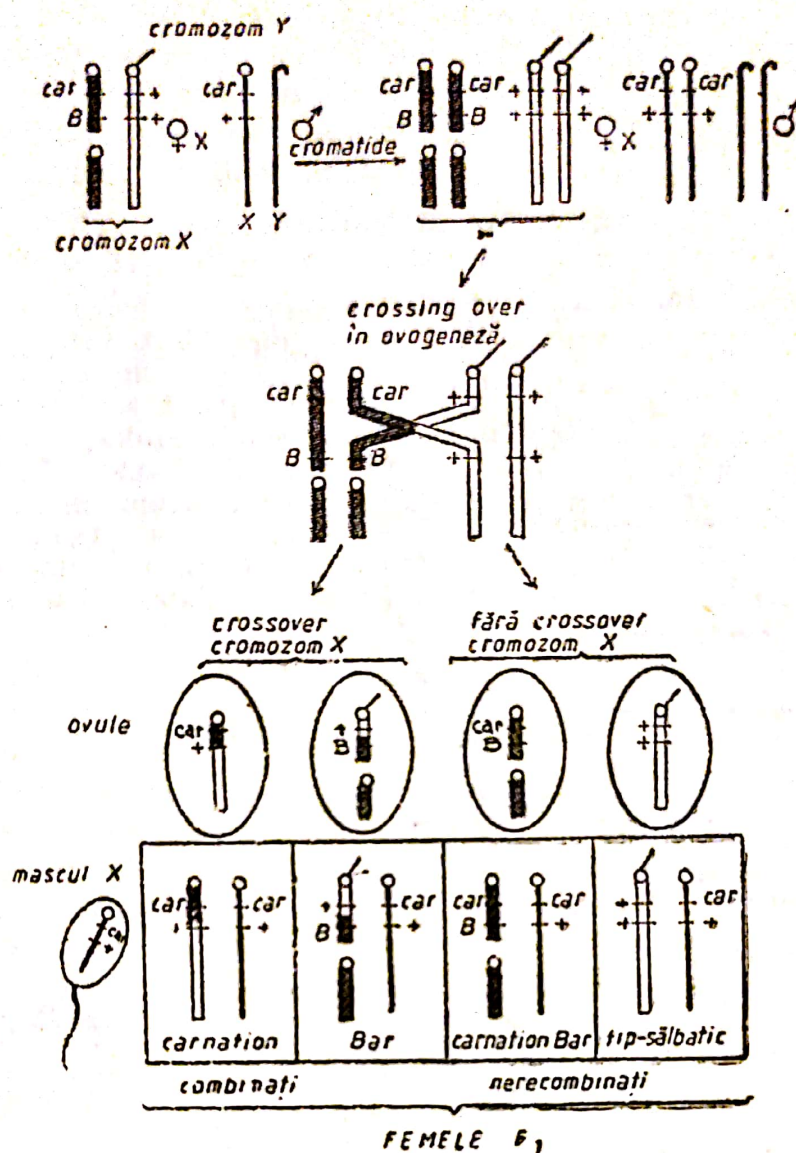


Fig. 53. B. Diagrama experienței lui Stern efectuată la *D. melanogaster* în care este redată corelația dintre crossing-overul citologic și crossing-overul genetic dintre doi loci sex-lincați, *carnation* și *Bar*. S-a folosit un stoc care prezenta rămănieri cromozomale spre a se obține o femelă care să aibă un segment al cromozomului Y atașat la unul din cromozomii săi X. Celălalt cromozom X era compus din două fragmente aproximativ egale, fiecare cu centromerul său propriu. Ca atare, cei doi cromozomi X puteau fi deosebiți la microscop. Unul dintre fragmentele cromozomului X purta alelele mutante *car* (culoare recesivă a ochilor *carnation*) și *Bar* (B formă îngustă, semidominantă a ochilor). Cromozomul lung X-Y purta alelele normale ale acestor marcheri (după C. Stern, 1931).

Lindegren în 1933 studiind ciuperca ascomicetă *Neurospora crassa*. De asemenea prin același studiu autorul a demonstrat că fenomenul implica doar două din cele patru cromatide.

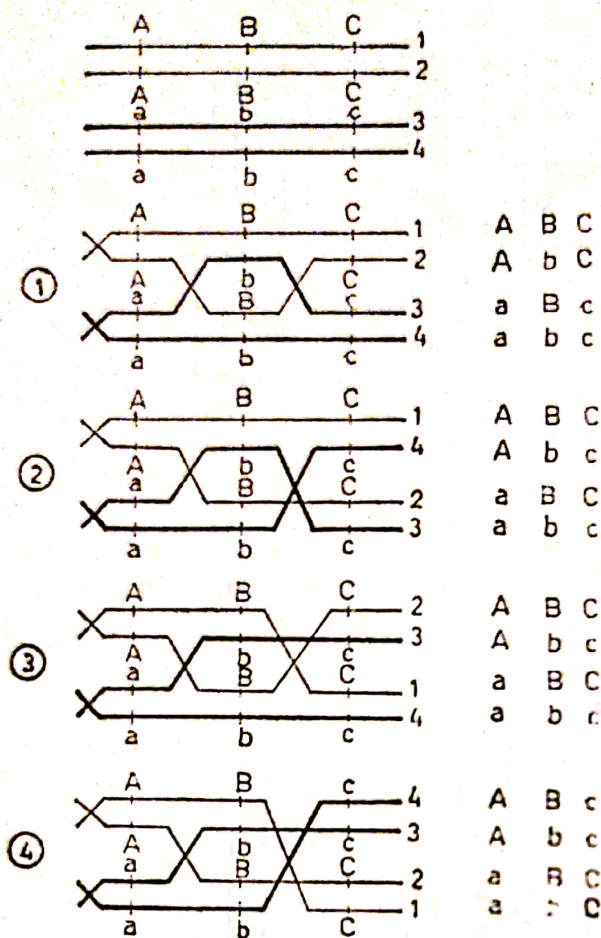
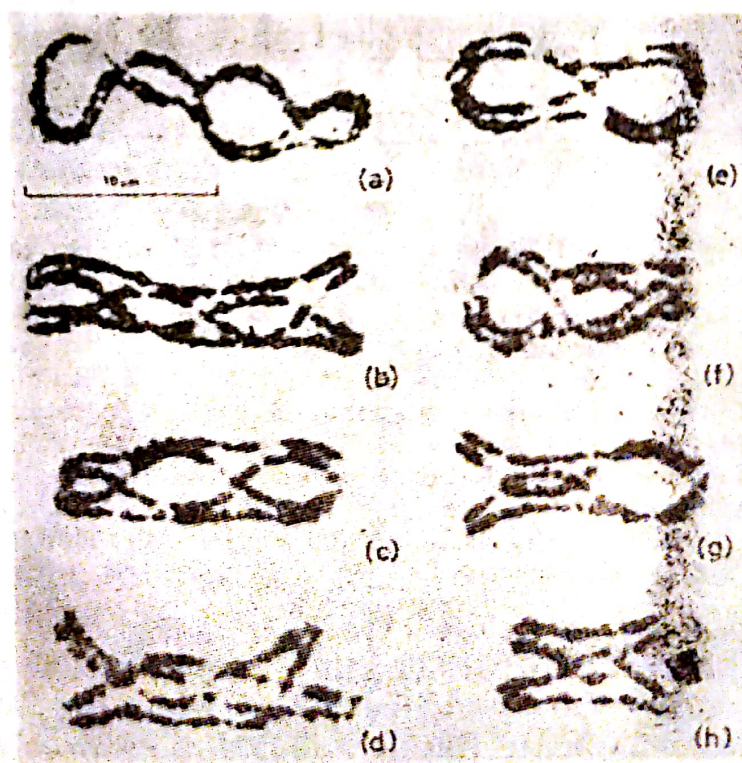


Fig. 59. A. Cele patru tipuri de dublucrossing-overe (între a și b și între b și c) și gameții recombinanți rezultați din meioză în care au loc acestea. În cadrul schimbului dublu sînt implicate două cromatide 1, trei cromatide 2 și 3 și patru cromatide 4). 1, 2, 3, 4 cromatidele cromozomilor omologi.

Fig. 59. B. Bivalenti de *Chortippus parallelus* aflați în stadiul de diploten prezentînd chiasme multiple care condiționează schimbul de material genetic între cromatide nesurori. (a) — cinci chiasme (b), (c) și (f) — patru chiasme; (d), (e) și (g) — trei chiasme; (h) — terminalizarea chiasmelor (după B. John și K. R. Lewis, 1973).



În 1916 Müller a arătat că apariția unui crossing-over într-o anumită pereche de cromozomi interferă cu apariția coincidentă a unui alt crossing-over în aceeași pereche de cromozomi. Acest fenomen s-a numit *interferență-genetică* și reprezintă, după Morgan, cea de-a cincea lege a eredității.

Există patru relații posibile dintre cromatidele implicate în crossing-overe (fig. 59A, B).

În cadrul unor încrucișări trifactoriale (trihibridare) cum ar fi aceea dintre o femelă homozigotă triplu mutantă de *D. melanogaster*, cu corp galben (*yellow* = *y*), ochi rugoși (*echinus* = *ec*) și aripi tăiate (*cut* = *ct*) și un mascul normal (corp cenușiu, ochi normali, aripi normale — *+++*) se poate urmări desfășurarea fenomenului de crossing-over, cu stabilirea poziției relative a celor trei marcheri genetici *y*, *ec* și *ct* pe cromozom — adică cu realizarea unei cartări genice. S-a stabilit că cei trei marcheri genetici sînt sex-lincați, adică localizați pe cromozomul X. În prima generație se obțin 50% femele normale dar triplu heterozigote ($\frac{(y \ ec \ ct)}{+ \ + \ +}$) și 50% masculi triplu mutanți $\frac{y \ ec \ ct}{- \ - \ -} \rightarrow \frac{x}{y}$ la care genele recesive *y*, *ec*, *ct*, se manifestă în stare hemizigotă, cromozomul Y ($\rightarrow$) nefiind omolog cu X. Raportul de egalitate dintre sexe rezultă din mecanismul de transmitere ereditară a sexului, de determinism cromozomal al acestuia (XX — femelă, XY — mascul) care face ca raportul dintre sexul femel și sexul mascul să fie 1 : 1. Când femelele normale, dar triplu heterozigote din F_1 au fost încrucișate cu frații lor triplu-mutanți în cadrul unei încrucișări numite *test-cross* s-a obținut un număr total de 2880 indivizi dintre care 1071 erau triplu mutanți, 1080 erau normali (tip sălbatic) iar restul prezentau caractere recombinante. O primă categorie de indivizi recombinanți în număr de 78 prezentau corp galben, ochi normal și aripi normale, iar 66 prezentau corp normal, ochi rugoși și aripi tăiate. Aceasta înseamnă că ei au apărut în urma unui crossing-over simplu dintre genele *y* și *ec*.

O a doua categorie de indivizi recombinanți, apăruti tot în urma unui crossing-over simplu se prezenta astfel: 282 de indivizi aveau corp galben, ochi rugoși și aripi normale și 293 prezentau corp normal, ochi normali și aripi tăiate. Acești indivizi recombinanți au derivat în urma unui crossing-over simplu realizat între genele *ec* și *ct*.

În sfîrșit o a treia categorie a cuprins 10 indivizi recombinanți dintre care: 4 indivizi erau cu corp galben și aripi tăiate

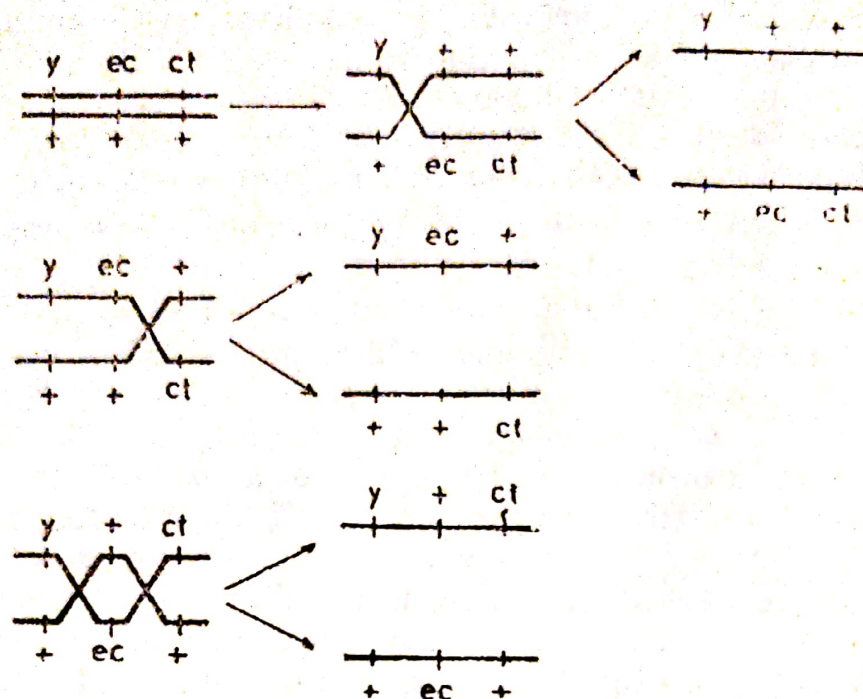


Fig. 60. Rezultatul crossing-overului simplu și crossing-overului dublu.

și 6 prezentau corp normal, ochi rugoși și aripi normale. O asemenea categorie de indivizi nu poate să apară decât în urma unui crossing-over dublu (mai corect spus două crossing-overe simple realizate simultan între trei gene) unul între *y* și *ec* și altul între *ec* și *ct* (fig. 60).

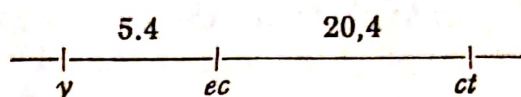
Ordinea genelor *y*, *ec* și *ct* pe cromozom pînă acum este prezumtivă. Datele segregării în F_2 ne ajută însă să stabilim ordinea exactă, precum și distanța relativă dintre aceste trei gene pe cromozom.

Pentru aceasta va trebui să calculăm frecvența de recombinare dintre fiecare pereche de markeri (recombinarea rezultată din crossing-overul dublu adăugîndu-se la recombinarea rezultată prin crossing-overul simplu) raportîndu-se la numărul total de indivizi ai descendenței. Astfel, frecvența de recombinare dintre *y* și *ec* va fi: $\frac{78 + 66 + 10}{2880} = 0,054$. Frecvența de recombinare dintre *ec* și *ct* va fi: $\frac{282 + 293 + 10}{2880} = 0,203$.

Frecvențele de recombinare pot reprezenta unități de cartare dacă vor fi înmulțite cu 100. Astfel, între *y* și *ec* se află

5,4 unități de cartare, pe cînd între *ec* și *ct* se află 20,3 unități de cartare.

Aceasta înseamnă că în conformitate cu așezarea liniară a genelor pe cromozomi dovedită atît la procariote (prin constatarea că genele bacteriene sînt transferate secvențial în timpul conjugării) cît și la eucariote (prin constatarea fenomenelor de lincaj și crossing-over care presupun o ordine liniară), cele trei gene nu pot fi așezate pe cromozomul X decît în ordinea și la distanțele următoare:



Frecvența de recombinare dintre *y* și *ct* este calculată adunînd frecvențele de recombinare corespunzătoare primelor două clase de indivizi recombinanți, fără a mai adăuga numărul indivizilor din a treia clasă: $\frac{78 + 66 + 282 + 293}{2880} = 0,249 \times 100 = 24,9$.

Din însumarea unităților de cartarea (numite și morganide) dintre *y* și *ec* și *ec* și *ct* rezultă: $5,4 + 20,3 = 25,7$.

Dar s-a găsit că între *y* și *ct* se află 24,9 unități de cartare. Există deci o diferență de 0,8 între frecvența de recombinare calculată între *y* și *ct* și suma frecvențelor de recombinare dintre *y* și *ec* și *ec* și *ct* (frecvențe parțiale). Această diferență se datorește apariției crossing-overului dublu. Dacă în intervalul *y-ct* apar două crossing-overe unul dintre aceștia anulează pe celălalt, eliminînd în fapt recombinarea, deoarece în urma crossing-overului dublu sau multiplu o parte din segmentele schimbate prin crossing-overul simplu revin pe cromatida inițială.

Cu cît genele stau mai îndepărtate pe cromozom, distanța aparentă dintre ele, stabilită prin încrucișări bifactoriale, devine progresiv mai redusă prin apariția crossing-overelor duble.

Există o interferență clară exercitată între chiasmele realizate între aceleași două cromatide ale bivalentului meiotic. Analizînd datele experienței de trihibridare se poate constata că dublu-crossing-overul apare cu o frecvență de 0,34% printre descendenți. Frecvența de recombinare dintre *y* și *ec* înmulțită cu aceea dintre *ec* și *ct* ar trebui să fie egală cu aceea cu care apare dublu-crossing-overul. Dar, dintr-un asemenea produs, rezultă $0,054 \times 0,203 = 0,011$ sau 1,1%. Diferența dintre datele așteptate (1,1%) și cele observate (0,34%) arată că cele două evenimente de schimb din cadrul crossing-overului dublu

nu sînt independente unul de celălalt și un asemenea fenomen se numește *interferență pozitivă*. În cadrul acestui fenomen apariția unei chiasme, după ce o altă chiasmă s-a format mai înainte, nu poate avea lor decît la o anumită distanță față de aceasta. Numărul de dublu-crossing-overe poate fi determinat prin stabilirea așa-numitului *coeficient de coincidență*. Acesta este egal cu unitatea atunci cînd schimburile nu se influențează unul pe celălalt. În cazul considerat valoarea coeficientului de coincidență este egală cu $0,34/1,1 = 0,31$. Aceasta înseamnă că din numărul total de crossing-overe care poate apare între cele trei gene *y*, *ec* și *ct* doar 31% apar în realitate. Interferența pozitivă nu se manifestă cînd markerii genetici se află de o parte și de alta a centromerului, deci nu pe același braț cromozomal. Fenomenul de schimb apare de asemenea la o anumită distanță față de centromer și o asemenea distanță a fost numită *distanță diferențială*.

Interferența genetică dintre crossing-overe este atribuită poziției unui punct de schimb care interferează cu poziția unui punct de schimb învecinat. Acest fenomen a fost numit de Mather „interferența chiasmelor”. Termenul corect ar fi „interferența poziției de cross-over” sau mai simplu *interferența de poziție*, căci spunînd interferență a chiasmelor folosim un termen citologic spre a descrie un fenomen genetic. Modelul de distribuție a chiasmelor în cromozomi este în acord cu ipoteza corespondenței chiasmelor cu punctele de crossing-over.

În concluzie se poate spune că fenomenul crossing-over apare între două dintre cele patru cromatide ale bivalentului meiotic (tetrada cromatidiană). Aceste cromatide implicate în schimb sînt alese mai mult sau mai puțin randomizat în cadrul fiecărui eveniment de schimb. În meioză se descrie și fenomenul de segregare a centromerilor, care în esență reprezintă separarea cromozomului de origine maternă de cel de origine paternă. Segregarea centromerilor se desfășoară în prima diviziune meiotică. Chiasmele și punctele de crossing-over apar cu aceeași frecvență și prezintă intensități corespunzătoare de interferență.

Demonstrarea directă a schimbului fizic desfășurat în meioză între cromozomi omologi, în sprijinul teoriei chiasmaticipiei a fost făcută de către Callan și Lloyd, în 1956 la cromozomul *Lampbrush* de *Triturus cristatus*. Demonstrarea naturii reciproce a crossing-overului se poate realiza în condiții foarte clare

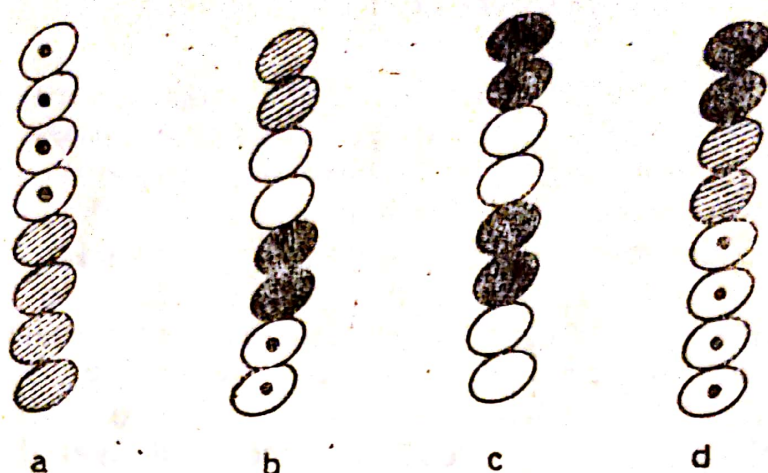


Fig. 61. Rezultatul exprimării fenotipice (e) a crossing-overului dublu în încrucișarea dintre mutanta cu ascospori *buff* (albicioși) și mutanta cu ascospori galbeni (*yellow*) de *Sordaria brevicollis*. Sporii tipului sălbatic sînt negri, iar cei ai dublu mutantului sînt albi (incolori). Genele mutante *y* (*yellow*) și *b* (*buff*) prezintă linca incomplet cu 9% recombinare. (a) Ască cu 4 spori *buff* (punct central) și 4 spori galbeni (hașurați) în care nu apare crossing-over între *y* și *b*. (b) Ască cu 2 ascospori galbeni 2 albi, 2 negri și 2 *buff*. Crossing-over între *y* și *b*. (c) Ască cu 2 perechi de ascospori negri și 2 perechi de ascospori albi. Segregarea apărută în urma unui crossing-over dublu, tetracromatidic dintre cei doi loci. (d) Ască cu o secvență de 2 spori negri, 2 galbeni și 4 *buff* prezentînd consecința conversiei genei *y* spre tipul sălbatic.

la ciuperca *Sordaria brevicollis*, folosind mutante ce au afectată culoarea ascosporului (fig. 61).

Prima dovadă fără echivoc în sprijinul ipotezei ruperii-reunirii după care are loc crossing-overul în timpul primei diviziuni meiotice este adusă prin studiile autoradiografice ale lui Taylor în 1965, folosind marcajul radioactiv cu ^3H -timidină a spermatocitelor de la lăcusta *Romalea microptera*. Timidina tritiată a fost introdusă în penultima replicare a ADN de dinaintea meiozei. Modelul de marcaj a fost observat în anafaza primei diviziuni meiotice, în metafaza și anafaza celei de-a doua diviziuni meiotice cînd cromozomii fii sînt bine separați. Prin acest studiu, Taylor a demonstrat pentru prima dată veridicitatea ipotezei chiasmatiei, a ruperii-reunirii, în realizarea crossing-overului, existînd o corelație directă între schimbul segmentelor radioactive și frecvența chiasmelor. De asemenea prin acest studiu autoradiografic s-a realizat o demonstrație directă a modelului de separare a centromerilor omologi în prima diviziune meiotică.

6. CROSSING-OVERUL SOMATIC

Numit încă crossing-overul mitotic, acest fenomen a fost descoperit de către Stern tot la drosofilă. Desfășurându-se după aceleași mecanisme care stau la baza crossing-overului meiotic, se deosebește de acesta prin aceea că, în primul rînd, se desfășoară în celulele somatice (în special în țesuturile embrionare) și în al doilea rînd, că recombinarea realizată prin intermediul său, nu se răsfrînge asupra întregului organism recombinant, ci numai asupra unei porțiuni reduse a acestuia, reprezentînd clona rezultată din celula somatică în care într-un stadiu embrionar timpuriu s-a realizat crossing-overul. Totodată, crossing-overul somatic afectează un număr mult mai mic de indivizi decît afectează crossing-overul meiotic.

Au fost analizate femele de drosofilă normale, dar heterozigote pentru doi markeri genici y — culoarea galbenă a corpului și sn -*singedbristles* (perișori creți) ambele gene X — lincate. Pe cîteva din asemenea femele dublu-heterozigote $\left(\begin{smallmatrix} +sn \\ +y \end{smallmatrix} \right)$ au fost observate perechi de pete la nivelul cărora apăreau fenotipuri complementare. Astfel la nivelul uneia culoarea corpului era normală (cenușie) dar prezenta perișori *singed* pe cînd cealaltă avea culoare galbenă dar perișori normali (fig. 62).

Schimbul de material dintre cromozomi omologi este posibil să se realizeze și în mitoză, dat fiind faptul că și aici poate avea loc împerecherea dintre cromozomii omologi, remarcată în unele situații în profaza mitotică.

Crossing-overul mitotic a fost remarcat și la organisme eucariote inferioare precum ciuperca *Aspergillus nidulans* la care, prin unire de filamente hifale ce aparțin la tipuri genetice diferite se obține *heterocarionul* care conține un amestec de tipuri nucleare de la cei doi părinți.

Astfel, într-un heterocarion format între un auxotrof *ad* (dependent de adenină) care produce conidii galbene (y) și un auxotrof pentru acid p -aminobenzoic (pab) care produce conidii albe (w), nucleii în sectorul diploid vor avea genotipul $\frac{+}{y} \frac{+}{w}$ ad pab . Acest sector va fi *prototrof* (nu va fi dependent de adenină sau acid p -aminobenzoic) și hifele sale vor forma conidii verzi în vîrf. Aceste conidii sînt mai mari (sînt diploide). Asemenea conidii izolate și cultivate vor germina formînd hife diploide.

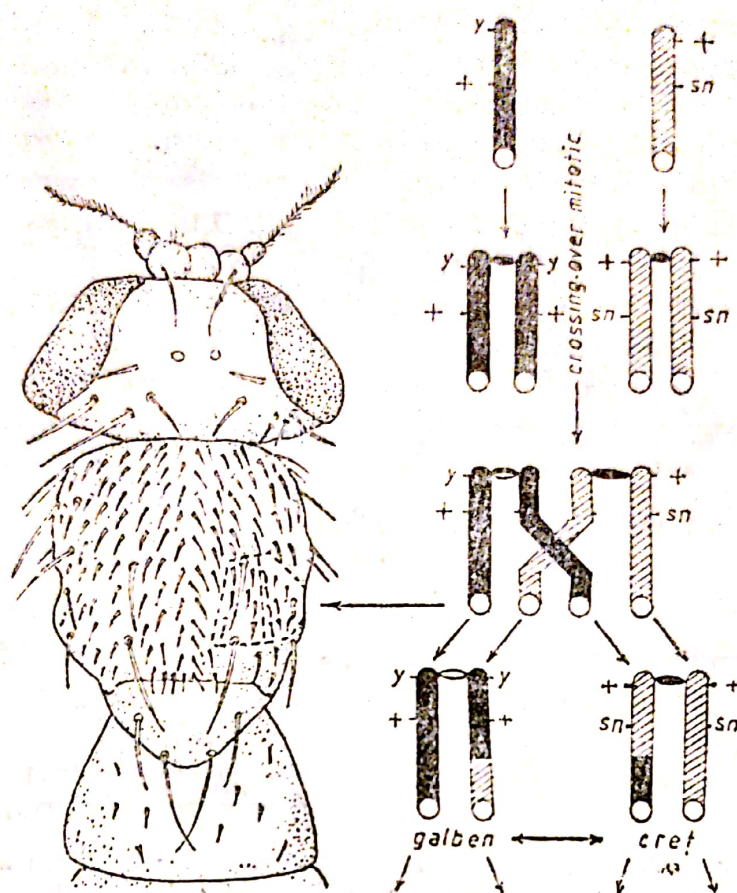


Fig. 62. Diagrama crossing-overului somatic la *Drosophila melanogaster*. Stînga : torax de musculiță heterozigotă pentru mutațiile corp galben (y) și perișori creți (*singed bristles* = sn) cu o pereche de pete gemene în care efectele acestor gene recesive sînt vizibile — pată galbenă și perișori drepiți în partea stîngă și pată cenușie și perișori creți în partea dreaptă. În dreapta se prezintă mecanismul considerat al crossing-overului mitotic ce duce la formarea celor două pete gemene (din Levine, 1973).

Coloniile formate au fentip normal. În unele cazuri la nivelul unor anumite sectoare, nu va apare fenotip normal ci caracterele mutante. Astfel, printre hifele care dau conidiile verzi pot apare hife care dau naștere la hife galbene sau albe, la nivelul acestor hife avînd loc segregarea care duce la separarea alelelor dominante de cele recesive. Sectoarele segregante apar după Pontecorvo fie prin procesul de haploidizare datorat nondisjuncției mitotice, fie eliminării unora dintre cromozomii omologi ca urmare a neincluserii lor în placa metafazică.

Segreganții însă pot apare și în urma crossing-overului mitotic desfășurat la nivelul heterozigoților diploizi și în cadrul căruia cromozomii omologi, după ce s-au replicat, schimbă reciproc segmente.

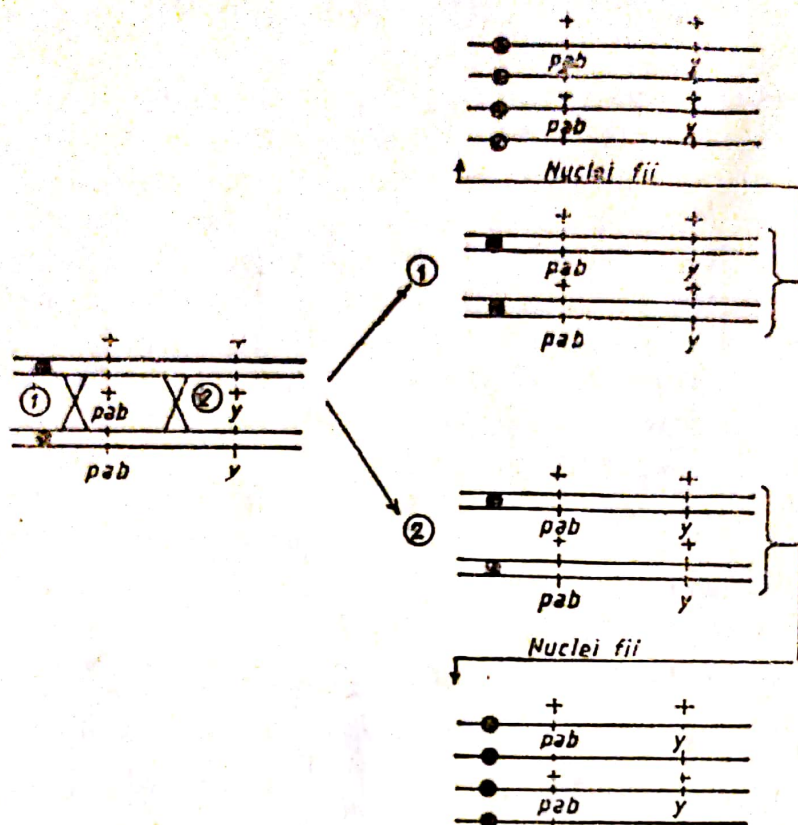


Fig. 63. Rezultatul crossing-overului realizat prin schimb între centromer și markerul *pab* (1) și între markerii *pab* și *y* (2).

Dacă crossing-overul apare între centromer și markerul *pab* se obține același rezultat ca în cazul în care crossing-overul are loc între *pab* și *y* (fig. 63).

La sfârșitul metafazei are loc clivarea centromerilor și în anafază migrează spre poli opuși (în nucleii fii diferiți) cele două cromatide ale fiecărui cromozom, care poartă markeri genetici diferiți.

În condiție haploidă alelele recesive se manifestă fenotipic.

7. CROSSING-OVERUL INEGAL

Realizarea crossing-overului presupune rupere-reunire la același nivel în cei doi cromozomi omologi, din care cauză se realizează un schimb echilibrat, reciproc de segmente egale de cromozomi, cu un număr egal de gene. Uneori însă ruperile omologilor nu sînt simetrice din care cauză cromatidele reali-

zează un schimb inegal de segmente. Un asemenea fenomen se numește *crossing-over inegal*. Datorită *crossing-over*ului inegal locusul unei gene, pe unul dintre omologi se dublează iar pe celălalt cromozom nu va fi reprezentat nici într-o singură copie. Ca urmare a unui *crossing-over* inegal a apărut la drosofilă mutanta *Bar* determinată de o genă dominantă *B* care determină ca ochii să fie reduși, căpătînd formă de bară. Tipul sălbatic are ochii cu circa 800 fațete. La heterozigoți pentru gena *B* ochii au circa 350 fațete iar la homozigoți sînt 70 fațete. Există și o mutantă *ultrabar* care în condiție heterozigotă $\hat{B}B/B^+$ are ochii cu 50 fațete iar în condiție homozigotă există doar 25 fațete.

Cel care a explicat apariția mutantei *Bar* pe calea *crossing-over*ului inegal a fost A. Sturtevant, în 1925.

Din încrucișarea unei femele $f^+B fu^+/fB fu$ (în care *f* — *forked* = bifurcate, *B* — locusul *Bar* și *fu* — nervuri fuzionate, toate genele acestea fiind localizate pe cromozomul X) cu un mascul hemizigot $fB^+fu/-$ a obținut femele și masculi nerecombinanți ($f^+B fu^+/fB^+fu$ și $fB fu/fB^+fu$) și indivizi masculi și femeli recombinanți ($fBB fu^+$ și $f^+BB fu$) ca și indivizi normali (fB^+fu^+ sau f^+B^+fu).

S-a considerat că în acest caz are loc schimbarea dozei de gene pe socoteala cromozomilor omologi prin schimb inegal de segmente.

Se obțin următoarele clase de indivizi:

$$\frac{f^+B fu^+}{fB^+fu} \text{ și } \frac{fB fu}{fB^+fu} \quad \frac{fB fu^+}{fB fu^+} \quad \frac{f^+B fu}{f^+B fu} \quad \frac{f^+B fu^+}{f^+B fu^+}$$

care nu prezintă *crossing-over* și $\frac{fB fu}{fB fu}$ care sînt recombinanți dar apar și unii indivizi dublu-*Bar* sau *ultra-Bar* $fBB fu^+$ și $f^+BB fu$ și indivizi normali fB^+fu^+ și f^+B^+fu . (fig. 64)

*Crossing-over*ul inegal a fost descris și la porumb.

8. FACTORII CARE AFECTEAZĂ CROSSING-OVERUL

a. Sexul. La majoritatea plantelor și animalelor studiate s-au pus în evidență existența de chiasme și de *crossing-over* la ambele sexe. Nu se cunosc cazuri în care *crossing-over*ul să

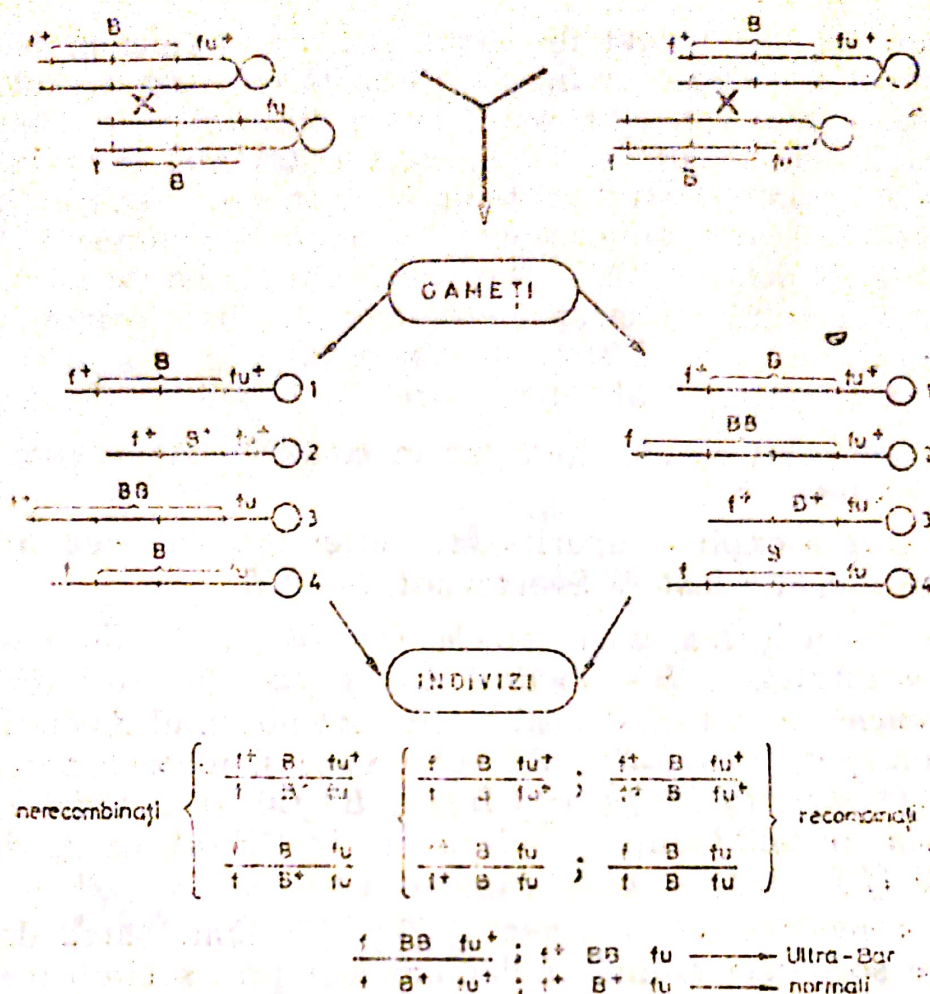


Fig. 64. Crossing-over inegal (modificat după Lobachev, 1967).

fie absent de la ambele sexe. Dar se cunosc cazuri, cum este și cel al drosofilei, la care crossing-overul este prezent la sexul homogametic (femela XX) și în mod normal absent la sexul heterogametic (masculul XY). În 1971, Hiraizumi arată pentru prima dată că poate avea loc recombinația genetică și la mascul, în cazul când acesta este heterozigot pentru o genă desemnată *Mr* (de la „male recombination“) aflată pe cromozomii din perechea a doua. Recombinarea afectează atât genele de pe perechea a doua de cromozomi, cât și genele de pe perechea a treia de cromozomi, crossing-overul apărînd în regiunile proximale, dar nu și în heterocromatina centromerică. Se admite că *Mr* determină un defect într-o anumită etapă a replicării sau reparării ADN, *Mr* fiind o mutație meiotică defectivă recombinational care cauzează de asemenea instabilitatea cromozomilor în mitoză.

De asemenea se cunosc alte trei specii de *Drosophila*, la care la masculi cel puțin în anumite linii se realizează crossing-over meiotic (Baker și Colab, 1976) deși cu o frecvență mult mai mică decât la femele. Crossing-overul la masculi se realizează fără organizarea complexului sinaptinomal sau cu complexe sinaptinemale imperfect dezvoltate.

La mamifere crossing-overul este absent la sexul mascul, cromozomii X și Y asociindu-se cap la cap, nu latură pe latură. Absența crossing-overului la masculul mamiferelor a avut o anumită importanță în evoluția acestora, ducând la conservarea structurii și deci și a funcției heterozomilor, asigurându-se un determinism corect al sexelor și un raport echilibrat dintre acestea.

Absența crossing-overului la un sex este însă o caracteristică specifică de specie și nu un caz general pentru toți masculii sau pentru sexul heterogametic.

La alte organisme crossing-overul poate avea loc la masculii XY sau femelele WZ. Motivul acestor diferențe este cu totul necunoscut.

La marea majoritate a speciilor de mamifere, păsări, pești și insecte însă, heterogameția sexului nu influențează desfășurarea crossing-overului. La om cromozomul X se împerechează cu cromozomul Y pe o porțiune foarte mică, la nivelul căreia se formează în profaza I a meiozei și un mic complex sinaptinomal.

b. Structura cromozomilor. Centromerul joacă un rol foarte complex în structura și funcția cromozomului. Centromerul este implicat în păstrarea integrității grupelor de înlănțuire a genelor. Sînt date după care centromerul joacă un rol important și în mecanismul crossing-overului. Astfel după unii autori în cromozomii metacentrici, la nivelul fiecăruia dintre brațe schimbul apare ca o funcție a distanței de la centromer. În mod normal în apropierea centromerului schimbul are loc foarte rar. Pe măsura îndepărtării de centromer frecvența schimbului crește după care, cu apropierea de telomere scade din nou. Acest fapt se remarcă la drosofilă, nu însă și la porumb, de exemplu.

Frecvența crossing-overului este influențată și de distribuția regiunilor heterocromatice și eucromatice pe cromozom. Datele cele mai multe indică faptul că porțiunile heterocromatice sînt caracterizate de o mai mare variație a frecvenței de schimb

sub influența factorilor de mediu extern. Este posibil ca influența heterocromatinei asupra frecvenței schimbului să se manifeste prin gradul său mai mare de spiralizare. Scăderea frecvenței crossing-overului în regiunea centromerică poate fi legată de spiralizarea mai mare a zonei pericentromerice cunoscută a fi de natură heterocromatică. Aberațiile cromozomale pot influența în așa măsură crossing-overul încât unele dintre ele, cum ar fi inversiile, anulează fenomenul.

c. **Starea fiziologică a organismului.** La drosofilă s-a stabilit că frecvența crossing-overului depinde de asemenea de vîrsta organismului. Vîrsta organismului influențează de fapt comportamentul meiotic al cromozomilor, constatîndu-se că nondisjuncțiile cromozomilor de la nivelul bivalentului se înregistrează cu o frecvență mai mare la o vîrstă mai înaintată. Și la femeie, după 35 ani frecvența nondisjuncției cromozomilor X crește, crescînd totodată riscul de a da naștere la copii cu grave sindroame (Turner, Klinefelter, superfemelă etc.). De asemenea poate avea loc nondisjuncția cromozomilor autozomi din perechea 21, fapt care stă la baza sindromului Down (mongoloidismul sau trisomia 21).

d. **Genotipul.** Toate procesele ce se desfășoară în celulă sînt determinate genetic. Este firesc ca și crossing-overul — unul dintre cele mai complexe și importante evenimente pentru celulă — să fie sub un anumit control genetic. Reglajul genetic al crossing-overului are loc la nivel molecular, manifestîndu-se în realizarea fidelității recombinării a două duplexuri ADN. La nivel cromozomal, genotipul acționează prin schimbarea politeniei cromozomului, a gradului de spiralizare. Dar cel mai evident apare influența genotipului în cazul remanierelor cromozomale, care cel mai adesea anulează sinapsa cromozomală. Aberațiile cromozomale ce au loc într-o pereche de cromozomi pot influența frecvența schimbului în cromozomii neomologi.

La porumb s-au descris gene care controlează sinapsa cromozomală (gena asinapsiei), spiralizarea și alipirea cromozomilor. S-a descris de asemenea o genă care controlează reducerea numărului cromozomilor în meioză. Este clar că asemenea gene pot influența și frecvența schimburilor între cromozomii omologi.

e. **Factori de mediu extern.** Anumiți factori de mediu extern pot influența desfășurarea crossing-overului. Astfel, variațiile

de temperatură, radiațiile ionizante, razele infraroșii, deshidratarea, absența din mediul celular lichid a ionilor de calciu și magneziu (care afectează în primul rând structura cromozomului) determină variațiuni în frecvența crossing-overului, influențând desfășurarea sa normală.

La drosofilă s-a arătat că procentul de crossing-over crește atât în condiții de scădere a temperaturii ($9-13^{\circ}\text{C}$) cât și în condiții de creștere a temperaturii ($30-32^{\circ}\text{C}$).

Considerându-se trei gene *b*, *pr*, *c* din grupa II de lincaj aflate la 48,5; 54,5 și respectiv 75,5 morganide față de centromer frecvența crossing-overului crește semnificativ prin creșterea și scăderea temperaturii de la 6,0% cât este la 22°C la 17,5% când temperatura scade la 13°C , respectiv la 18,2% când temperatura crește la 31°C în cazul crossing-overului dintre *b* și *pr*.

Recombinarea genetică pe calea crossing-overului asigură organismelor o mai mare labilitate adaptativă și plasticitate evolutivă.

Capitolul VII

EREDITATE EXTRANUCLEARĂ

1. DEFINIREA EREDITĂȚII EXTRANUCLEARE

Numită și ereditate citoplasmatică, ereditatea extranucleară se referă la fenomenele ereditare legate de structurile genetice, care nu sînt localizate în nucleu, organit în care se află cea mai mare cantitate a ADN celula și care joacă rol esențial în ereditate.

Comportamentul factorilor ereditari în concepția lui Mendel respectiv a genelor în concepția lui Morgan, se bazează pe fenomenul ereditar desfășurat la nivelul nucleului. Cum în diviziunea nucleului intervine mecanismul mitotic, sau meiotic care asigură o repartizare exactă, echilibrată a genelor în celulele fiice, comportamentul factorilor ereditari nucleari se caracterizează prin modele precise de segregare cu raporturi de segregare matematice. În studiul fenomenului ereditar au fost însă întîlnite și situații în care apar abateri de la modelul de segregare mendeliană, existînd tendința transmiterii preferențiale pe linie maternă. Din punct de vedere cantitativ, organismul matern prezintă o organizare nucleară identică cu aceea a organismului patern. Gameții femeli se deosebesc însă de cei masculi, prezentînd o cantitate de citoplasmă comparativ mult mai mare, această diferență stînd la baza transmiterii preferențiale pe linie maternă a unor caractere ereditare (Gavrilă, 1973).

Cel mai sigur criteriu al eredității extranucleare, la organisme la care gameții sînt profund diferențiați morfo-fiziologic (*anisogamie-heterogamie*) este acela al neidentității hibrizilor rezultați din încrucișări reciproce. În cazul eredității nucleare, deci mendeliene, genitorul matern și genitorul patern contribuie în egală măsură cu gene la formarea genotipului descendenților,

astfel încât încrucișările reciproce dintre părinți care prezintă genotipuri homozigote diferite ($AA \text{ ♀} \times aa \text{ ♂} = aa \text{ ♀} \times AA \text{ ♂} = Aa$) vor da descendenți cu genotip și fenotip identici.

În cazul în care factorii ereditari au localizare extranucleară, contribuția părinților la formarea zestrei genetice extranucleare a descendenților este diferită în încrucișările reciproce datorită diferențelor notabile dintre cantitatea de citoplasmă a ovulului și spermatozoidului. Pe de altă parte nu există un mecanism de tipul mitozei bunăoară, care să asigure repartizarea echilibrată a factorilor ereditari cu localizare extranucleară în celulele fiice. În acest caz, rezultatul încrucișărilor reciproce este diferit. Exemplul cel mai tipic este reprezentat de încrucișarea dintre iapă și măgar și încrucișarea dintre măgarită și armăsar. Calul — *Equus caballus* — are $2n = 64$ iar măgarul — *E. asinus* — are $2n = 62$. În ambele încrucișări contribuția genetică a nucleului este aceeași, hibrizii avînd în ambele cazuri $2n = 63$. Dar în primul caz hibridul este bardou iar în al doilea caz este catîr, bardoul diferențiindu-se net fenotipic de catîr. Această diferență nu poate fi deci pusă pe seama eredității nucleare, ci pe seama eredității extranucleare, a citoplasmei.

Existența eredității extranucleare, citoplasmatică este un indiciu că, în transmiterea caracterelor ereditare, adevărata unitate majoră este celula ca întreg.

Existența de *gene citoplasmatică* (Sager, 1972) a fost sugerată încă din 1909 de către Correns și Baur. Cercetările din 1940 ale lui Rhoades, efectuate la *Zea mays* au scos în evidență caracterul relativ autonom al eredității citoplasmatică. La microorganisme, cele mai multe date de ereditate extracromozomală au fost obținute de către Sager la *Chlamydomonas* și Slonimski la mutantele „petite” de *Saccharomyces cerevisiae*, ce au la bază mari deleții în ADN mitochondrial.

La plantele superioare s-au evidențiat două modele de transmitere a genelor extranucleare:

- modelul transmiterii stricte pe cale maternă evidențiat la porumb și la marea majoritate a plantelor analizate;
- modelul transmiterii biparentale dar în raporturi aberante de segregare (nemendelian) a genelor citoplasmatică, evidențiat la *Pelargonium* și *Oenothera*.

La *Chlamydomonas*, *Saccharomyces* și *Neurospora* s-a demonstrat lincajul genelor citoplasmatică, alături de mutabilitatea și recombinarea lor.

2. SUBSTRATUL FIZIC AL EREDITĂȚII EXTRANUCLEARE

Existența de ADN în citoplasma celulei este o realitate atît pentru procariote (alături de cromozomul principal se află și una sau mai multe molecule circulare de ADN mult mai mici decît cromozomul principal reprezentînd 1/100 din acesta) cît și pentru celula eucariotă la care a fost descris ADN în mitocondrii (cromozomul sau genomul mitocondrial) în cloroplaste (cromozomul sau genomul plastidial sau cloroplastic) posibil în corpii bazali (centriolii celulelor flagelate) (genomul centriolar). De asemenea nu a fost exclusă existența de molecule de ADN libere în citoplasma eucariotelor, apărînd sub formă de *episomi*. Unele aspecte de ereditate extranucleară s-ar putea baza pe existența unor molecule stabile de ARNm, această afirmație bazîndu-se pe faptul că unele celule enucleate de *Acetabularia* sau *Polyphisa* pot trăi un timp relativ îndelungat, continuînd să sintetizeze proteine pe baza folosirii ca matriță a ARNm sintetizat în nucleu, înainte de enucleare.

În sfîrșit, unele cazuri de ereditate extracromozomală au la bază existența în citoplasmă a unor particule endosimbiotice, cum ar fi bacteria *Caedobacter taeniospiralis* care reprezintă de fapt particulele „Kappa” de la parameci. La drosofilă se află în citoplasmă spirochete din genul *Treponema* și care sînt implicate în determinarea raportului dintre sexe (*sex-ratio*). ADN al organelor (cloroplaste, mitocondrii) este bicatenar și circular fiind de mărimea genomului bacterian, ADN cloroplastic fiind mai mare decît cel mitocondrial.

Mitocondriile și cloroplastele au un sistem propriu de sinteză proteinică, cu ribozomi proprii de tip procariot. Ele manifestă o reală semiautonomie genetică, între genomul nuclear și cel mitocondrial pe de o parte și cel cloroplastic pe de alta existînd interferențe funcționale. ADN cloroplastic ca și ADN mitocondrial nu se asociază cu histonele.

3. CAZURI DE EREDITATE EXTRANUCLEARĂ

3.1. EREDITATE NUCLEARĂ CU EFECT ÎNTÎRZIAT

Unul dintre cele mai cunoscute exemple de ereditate nucleară (mendeliană) întîrziată (predeterminarea) se referă la direcția de răsucire a cochiliei la melcul de apă dulce *Limnea*

peregra studiat de către Boycott și Diver în 1923. Tipul normal are corpul și cochilia răsucită după un model dextral de spirală, dar s-a descris și o variantă reprezentând o imagine în oglindă a tipului normal, prezentând corpul și cochilia răsucite *senestral*.

Diferența dintre tipul dextral și senestral este evidentă încă din cele mai timpurii stadii ale dezvoltării (fig. 65A) deoarece planul primei diviziuni în oul fecundat este diferit la aceste două forme. Caracterul *dextral* este dominant (*D*) față de cel *senestral* (*d*). *L. peregra* este hermafrodit, dar pe lângă autofecundare poate avea loc și fecundare încrucișată.

Direcția răsucirii este determinată de citoplasma ovulului fiind fixată aici încă înainte de fecundare, depinzând numai de genotipul mamei. În încrucișări reciproce $DD \times dd$ (fig. 65B) rezultă indivizi F_1 care au aceeași structură genotipică (Dd) dar care diferă după direcția de răsucire a cochiliei, această fiind asemănătoare cu aceea a mamei. În F_2 , toți indivizii prezintă cochilie cu răsucire dextrală. Unii indivizi din F_2 produc numai descendenți cu cochilie senestrală. Această înseamnă că citoplasma prezintă încă înainte de fecundare o condiționare ireversibilă a tipului de răsucire a cochiliei. Sub direcția genotipului matern este produsă în citoplasmă o substanță care se

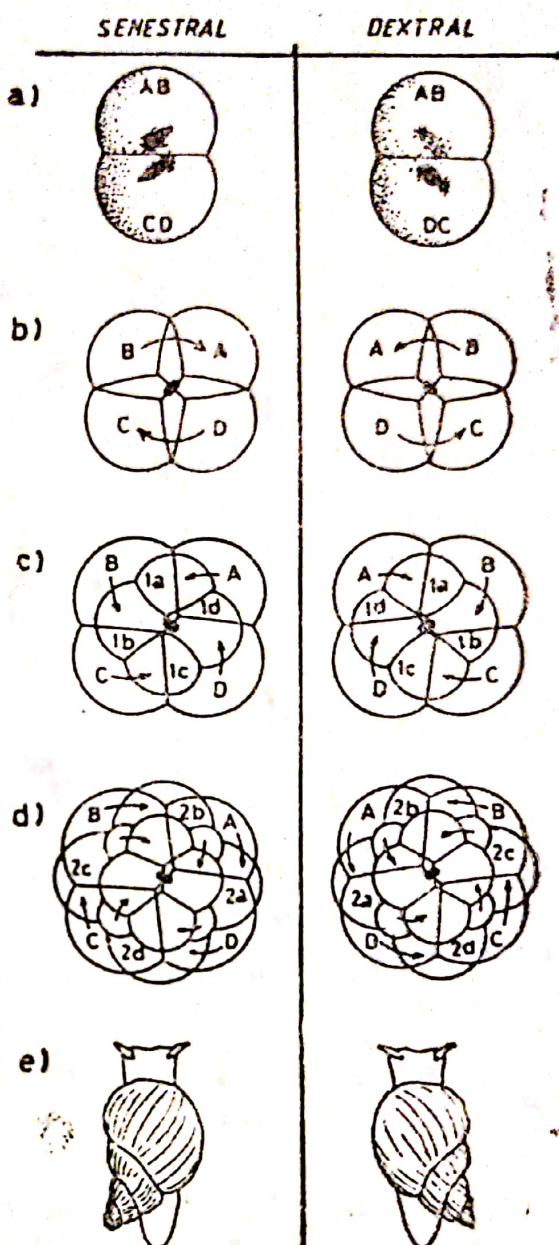


Fig. 65. A. Ereditatea răsucirii cochiliei la *Limnaea peregra*. (a–e). Secvența de evenimente celulare care determină răsucirea senestrală (spre stînga) sau dextrală (spre dreapta). (a–d). Clivajul timpuriu la nivelul ovulului prezentînd model specific de spiralizare. Săgețile indică direcția spre care se înclină fusurile mitotice în timpul diviziunilor de clivaj. Unele celule marcate cu litere și numere pot ulterior da naștere la țesuturi specifice. (e). Melci adulți.

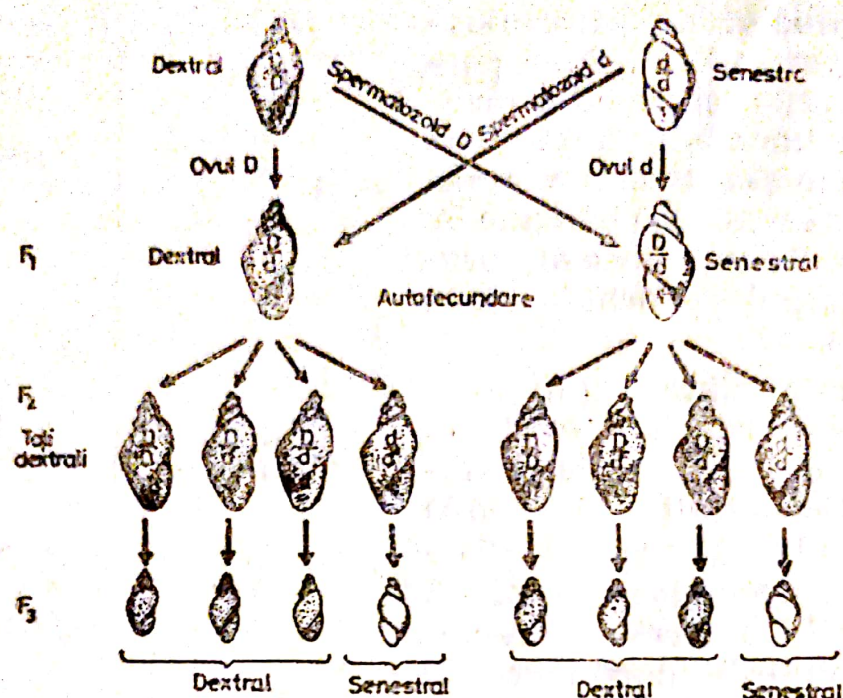


Fig. 65. B. Transmiterea caracterului senestral și dextral (după Conklin, E. G., 1903).

transmite apoi pe cale citoplasmatică interferând cu organiza-
rea fusului de diviziune căruia îi determină dextralitatea sau
senestralitatea.

3.2. EREDITATE EXTRANUCLEARĂ BAZATĂ PE GENE PLASTIDIALE

La porumb Rhoades a descris un caz particular de dungare
(variegare) a frunzelor numit *iojap* (de la soiurile de porumb
Iowa și Japonica). S-a stabilit că gena *ij* în stare homozigotă
determină fie moartea plantelor, fie variegarea frunzelor. Dacă
în încrucișare se folosesc în calitate de genitor matern plante
variegate (*ij ij*) se obține o segregare în care apar plante verzi,
plante cu frunze albe și plante cu frunze variegate, indiferent
de constituția genotipică nucleară a genitorului patern. În în-
crucișarea reciprocă $Ij Ij \text{♀} \times ij ij \text{♂}$ toată descendența este
normală (fig. 66). Rezultă că acest caracter *iojap* se transmite
pe linie maternă. Odată stabilit acest caracter devine perma-
nent și independent de gena *ij*, fapt dovedit de rezultatul în-
crucișării plantelor *Ij ij* (variegate) din F_1 folosite ca genitor

matern cu plante normale $Ij Ij$ (verzi) folosite ca genitor patern și care dau un amestec de plante cu frunze verzi, variegat și albe chiar dacă unele din plantele cu frunze variegat sau cu frunze albe au genotipul $Ij Ij$.

La *Chlamydomonas reinhardtii*, cercetările lui Sager și Gilham asupra markerilor de rezistență la antibiotice de la această algă verde flagelată au stabilit transmiterea doar pe linie maternă (tipul sexuat mt^+) a acestora (Gavrila, 1978).

3.3. EREDITATE EXTRACROMOZOMALĂ BAZATĂ PE GENE MITOCONDRIALE

La *Neurospora crassa* au fost descrise mutații care se moștenesc pe linie maternă. Din această clasă face parte și mutația *poky* care crește încet și prezintă mitocondrii slab diferențiate. Mitocondriile sînt deficiente în citocromii b , a_1 și a_3 legați de membrana mitocondrială și care sînt proteine esențiale ale lanțului respirator de transport de electroni. S-a tras concluzia că acest caracter *poky* este determinat de mutația unei gene mitocondriale. La această mutantă se află un număr mult mai mic de subunități ribozomale mitocondriale mici. Fără a apare diferențe în densitatea de plutire a ADN mt de la mutantă *poky* și de la tipul sălbatic s-a stabilit că acest caracter *poky* se moștenește pe linie maternă. Dacă protoperitecia (element femel) derivă de la o hifă de tip sălbatic toți cei

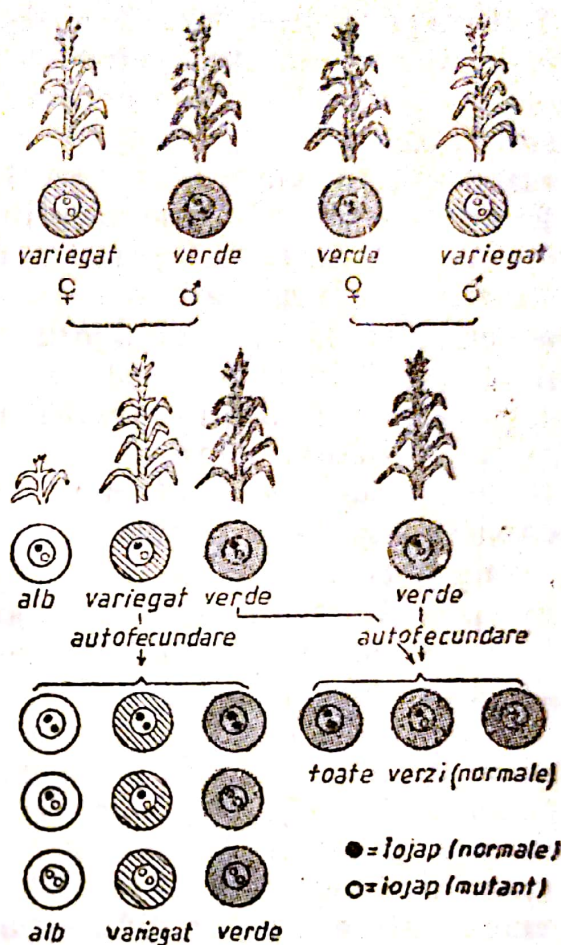


Fig. 66. Ereditatea variegării la frunzele de porumb. În stînga se redă încrucișarea dintre plante femele variegat (ij/ij) care dă trei tipuri de descendenți: albi, variegat și verde normali. Plantele femele F_1 (Ij/ij) produc de asemenea trei tipuri de descendenți, dintre care două tipuri sînt cu frunze albe sau variegat cu toate că genotipurile lor sînt normale Ij/Ij . Pe de altă parte, polenul de la plantele variegat nu transferă efectul de variegare cînd polenizează o plantă femelă normală (verde). Caracterul de variegare se transmite pe calea citoplasmei femele (după Sager, R., 1972).

8 ascospori care rezultă sînt de tip *poky*. În încrucișarea reciprocă toți ascosporii sînt de tip sălbatic.

La *Saccharomyces cerevisiae* apar mutații care au afectat sistemul respirator, dar spre deosebire de *Neurospora* la care asemenea mutante au o viabilitate extrem de scăzută (ciuperca fiind un aerob obligat) drojdia — care este un anaerob facultativ — poate crește prin fermentație în absența completă a funcțiunilor respiratorii mitocondriale. Mutațiile la drojdie care se manifestă prin deficiențe respiratorii sînt mutații condiționale, condiționînd o creștere normală în condiții anaerobe dar o creștere limitată în condiții aerobe.

B. Ephrussi și colab. au observat printre coloniile mari de *S. cerevisiae* și colonii mici „petite”. Aceste celule petite nu au capacitatea de a respira, dobîndindu-și energia doar pe calea fermentației, cale ineficientă din care cauză creșterea lor este înceată. Rata de apariție spontană a fenotipului *petite* este foarte ridicată (100 la 1000 celule) iar prin tratare cu bromura de etidium toate celulele devin *petite*.

Slonimski a arătat că unele din aceste tulpini *petite* prezintă mutații în gena nucleară (*p*) numindu-se *petite segregational* (fig. 67), dar că majoritatea transmit acest caracter pe cale citoplasmatică, aceasta fiind o expresie adecvată, inadecvată fiind aceea de ereditate maternă la drojdie la care nu există celule sexuale diferențiate.

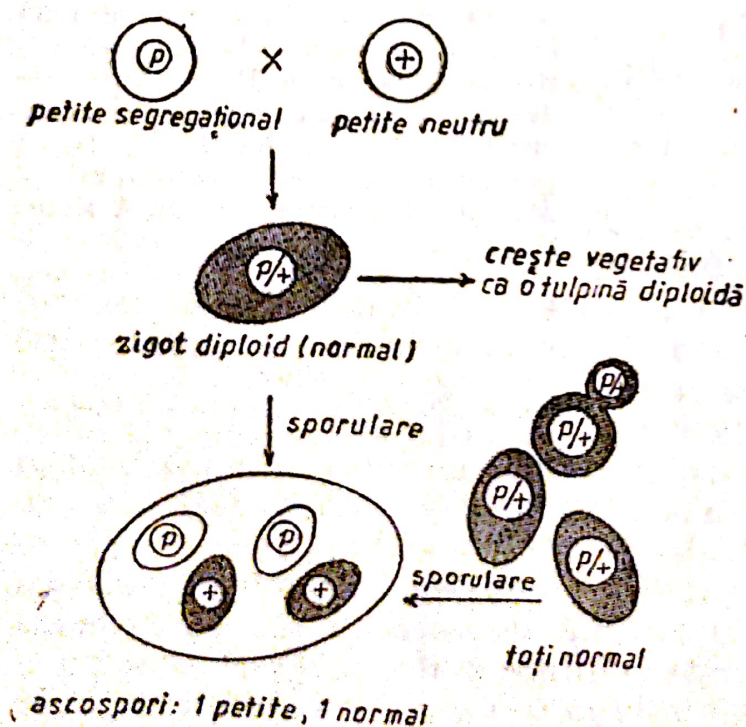


Fig. 67. Rezultatul încrucișării dintre tulpina „petite” segregatională și o tulpină „petite” neutră de *Saccharomyces cerevisiae* (după Wilkie, D., 1964. The cytoplasm in Heredity. Methuen, London).

Mutantele *petite* ce se transmit pe cale citoplasmatică se numesc *petite vegetative* sau neutre. Mutantele *petite* au la bază mutații în genele mitocondriale. Dacă ADN_{mt} normal are un conținut GC de 18% la mutantele *petite* cantitatea GC este foarte mică, uneori nulă, existând doar AT. Unele tulpini neutre *petite* nici nu posedă ADN_{mt}. Este vorba deci de mutații drastice în ADN_{mt} de tipul delețiilor care determină alterări în fenotipul mitocondrial.

ADN_{mt} al multor mutante *petite* continuă să fie sintetizat multe generații ceea ce sugerează că aparatul enzimatic al replicării ADN_{mt} este specificat de genomul nuclear. De asemenea sînt sintetizate și enzime ale ciclului Krebs localizate în mitocondrii dar specificate de genomul nuclear.

La drojdie au fost induse de asemenea mutații de rezistență la antibiotice (cloramfenicol și eritromicină) care se transmit pe linie maternă. Asemenea antibiotice acționează selectiv asupra proteinelor ribozomale mitocondriale de unde concluzia că aceste proteine, cel puțin o parte dintre ele, sînt specificate de gene mitocondriale. Se pare că cea mai mare parte a genomului mitocondrial este implicat în sinteza componentelor aparatului de sinteză proteică mitocondrială. Cel mai sigur apare a fi implicarea genomului mitocondrial în sinteza enzimelor citocromoxidaza (care intervine în finalul lanțului respirator mitocondrial) și în proteinele asociate intim cu membranele mitocondriale interne (criste).

3.4. ANDROSTERILITATEA

Androsterilitatea este incapacitatea de a forma gameți masculi sau dacă se formează aceștia sînt sterili, nefuncționali. Fenomenul androsterilității are determinism nuclear (a. nucleară), citoplasmatic (a. citoplasmatică) sau dublu (a. nuclear-citoplasmatică).

Datele actuale sugerează că androsterilitatea are la bază alterări în structura și funcția ADN mitocondrial.

Androsterilitatea a fost descrisă la multe plante (în, ceapă, porumb, sorg, sfeclă de zahăr, grâu, secară, floarea soarelui, ardei, cartof etc.). În cadrul încrucișării a două specii adesea rezultă hibrizi sterili cînd încrucișarea se realizează într-o direcție și hibrizi cu polen fertili sau semifertili cînd se realizează încrucișare reciprocă.

Dezvoltarea anterelor și polenului la hibrizi se află sub controlul interdependent al nucleului și citoplasmei. Manifestarea androsterilității citoplasmatică poate fi împiedicată de activitatea unor anumite gene nucleare.

La porumb, unele varietăți prezintă sterilitate a polenului determinată citoplasmatic, citoplasma acestora fiind cunoscută drept citoplasma *Texas* sau *cms-T*. Dar expresia acestei sterilități a polenului, cu determinism citoplasmatic este controlată de diferitele alele ale genelor nucleare Rf_1 și Rf_2 , gene dominante cu acțiune complementară. În toate constituțiile genetice nucleare în care cele două gene se află în stare dominantă (sînt complementare) nu poate să se exprime fenotipic citoplasma *Texas* și nu apare androsterilitate. Androsterilitatea este astfel condiționată doar de constituțiile genetice nucleare: $rf_1 rf_1 rf_2 rf_2$, $Rf_1 Rf_1$, $rf_2 rf_2$ și $rf_1 rf_1 Rf_2 Rf_2$.

Cele două gene prezente prin alelele lor dominante (Rf_1 , Rf_2) condiționează restaurarea fertilității polenului. Astfel, prin restaurator de fertilitate se înțelege acea varietate care, încrucișată cu o varietate androsterilă citoplasmatic, reface fertilitatea polenului la aceasta, rezultînd o descendentă androfertilă.

Citoplasma *Texas* s-a dovedit a fi extrem de utilă în producerea porumbului hibrid, androsterilitatea eliminînd dificila și neeconomicoasă operație de castrare a plantelor mamă folosite în obținerea de hibrizi simpli sau dubli de porumb.

Recent s-a demonstrat că genele pentru androsterilitate citoplasmatică sînt gene mitocondriale care totodată sînt responsabile de susceptibilitatea la rasa *T* a ciupercii *Helminthosporium maydis*.

La floarea soarelui, identificarea plantelor androsterile se realizează de timpuriu din stadiul de plantulă, acestea avînd tulpinița (hipocotilul) colorat cu antocian. Aceasta ajută foarte mult operația de obținere a hibrizilor simpli și dubli de floarea soarelui.

În ultimul timp, prin experiențe de amestec de mitocondrii izolate, s-a demonstrat că fenomenul de heterozis la hibrizii de porumb, ca și la alte plante se bazează pe amestecul de mitocondrii care produce efecte favorabile complementare asupra respirației (Grant, 1975), mărinđ intensitatea de respirație. Asemenea fenomene de complementație mitocondrială au fost întîlnite și la *Neurospora crassa*.

3.5. EREDITATE ENDOSIMBIOTICĂ

Acest tip de ereditate poate fi larg răspândit. Endosimbioza este un fenomen frecvent în natură și se crede chiar că a stat la baza originii celulei eucariote (Gavrila, 1978). Cele mai interesante situații de ereditate endosimbiotică au fost descrise la *Paramecium* și *Drosophila*.

La *Paramecium*, uneori, în procesul de conjugare, când acesta este prelungit, încît o punte citoplasmatică persistă și după transferul nucleilor, are loc nu numai schimb de micronuclei ci și un schimb de citoplasmă între parteneri. Dar odată cu citoplasma sînt transferați și endosimbionții.

Unii endosimbionți conferă gazdei lor anumite însușiri fenotipice care îi diferențiază de alte celule. Astfel, celulele de *P. aurelia* în care se află bacteria *Caulobacter taeniaspiralis* (particulele Kappa) au și caracterul „Killer” fiind ucigașe prin toxina eliminată pentru celulele care nu posedă aceste particule Kappa, ele fiind totodată rezistente la toxina produsă de această bacterie. Bacteria este infectată de un virus aflat în stare latentă lizogenă (provirus) în particulele Kappa numite „nestrălucitoare” de la unii parameci și în stare litică la alte particule Kappa în care se sintetizează un corp R proteinaceu și proteine virale, asemenea particule numindu-se „strălucitoare” și aflîndu-se în alți parameci ce prezintă caracterul „Killer”.

S-a admis că aceste elemente asemănătoare virusului ar fi responsabile de caracterul „Killer” iar corpul R ar facilita pătrunderea toxinei la forma sensibilă.

Menținerea particulelor Kappa în citoplasma parameciului este condiționată de prezența în nucleul acestuia a unor gene specifice. Astfel, dacă se lasă spre a se realiza conjugarea, fără schimb de citoplasmă celule „Killer” și celule sensibile, în urma conjugării rezultă două tipuri de clone celulare, una derivată din celula ucigătoare inițială alcătuită din celule „Killer” ce conțin particule Kappa, alta derivată din celula sensibilă inițială, sensibilă și fără particule Kappa.

Celulele din clona sensibilă, dau prin autogamie descendenți sensibili și fără particule Kappa. Celulele din clona „Killer” dau prin autogamie 50% descendenți care sînt purtători de particule Kappa și prezintă caracterul „Killer” și 50% descendenți sensibili și fără particule Kappa. Asemenea rezultate pot fi explicate numai dacă se admite că genitorul ucigaș are genotipul KK, gena K fiind o genă dominantă care conferă celulei capacitatea de a păstra particulele Kappa, iar genitorul

sensibil are genotipul kk , gena recesivă k necondiționind păstrarea în celulă a particulelor Kappa. Deși genotipul exconjuganților este Kk , deoarece în conjugare nu a avut loc schimb de citoplasmă și deci nu au fost transferate particulele Kappa de la celula Killer, numai celulele derivate din celula Killer inițială vor moșteni particulele Kappa (fig. 68a). Dacă prin autogamia celulei Killer exconjugată rezultă celule KK și kk , aceste celule kk , deși la început au în citoplasmă particule Kappa, ele cu timpul pierd asemenea particule căci gena k nu le conferă capacitatea de a le păstra în citoplasmă. Particulele Kappa nu se pot reproduce în citoplasmă decât în condițiile prezenței în genotip a genei K , fie în stare homozigotă (KK) fie în stare heterozigotă (Kk).

Cînd în procesul de conjugare se realizează și schimb de citoplasmă (fig. 68b) ambele clone derivate din cele două celule exconjugante prezintă genotipul Kk ca și în primul caz dar de această dată s-a realizat și transferul de particule Kappa la celula sensibilă. Deoarece în genotipul acestor celule a fost trecută prin fuziunea nucleară alela K , aceste celule au de acum capacitatea de a păstra particulele Kappa în citoplasmă și astfel de a fi și ele „ucigașe”. Prin autogamie, are loc segregarea

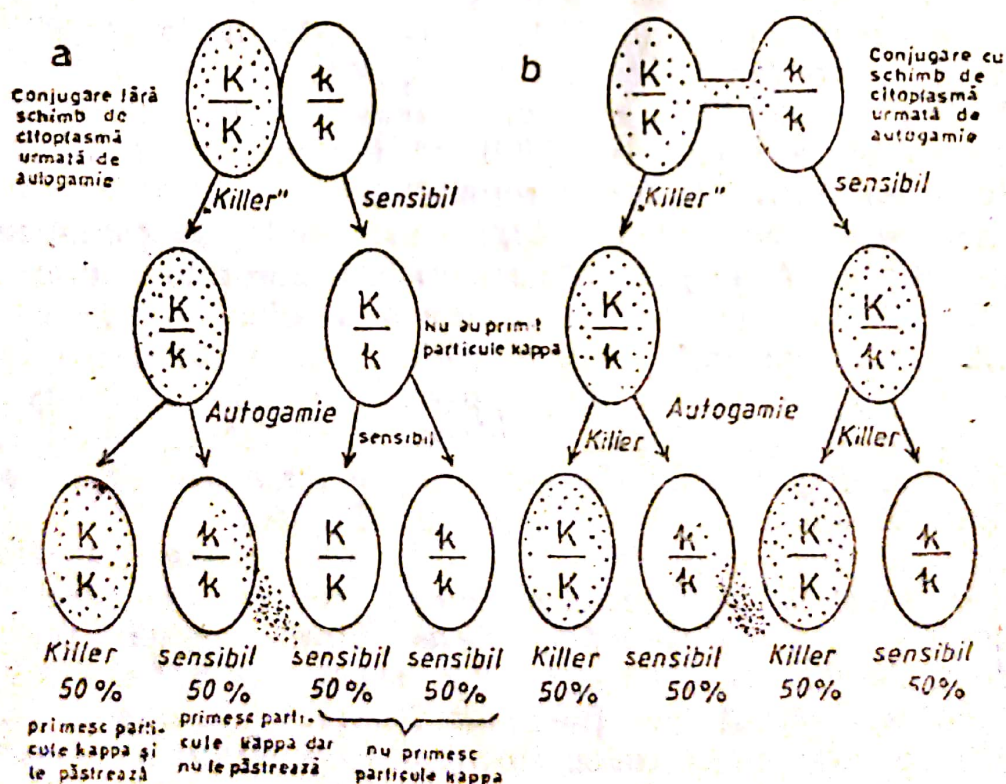


Fig. 68. Conjugarea la *Parameci* și ereditatea caracterului „Killer”.

de celule *KK* și *kk*, rezultând 50% celule ucigăse și 50% celule sensibile.

Prin tratamente cu mutageni (raze X, azot mustard) sau tratamente hipertermice, celulele care posedă particulele Kappa pot fi induse să piardă aceste particule.

Particulele Kappa nu au putut fi cultivate in vitro, sugerînd totală lor dependență de condițiile interne ale mediului celular. Ele nu reprezintă un component normal citoplasmatic la parameci, fiind un organism endosimbiotic.

Tot la parameci s-a descris și alt caracter transmis extra-nuclear. Este vorba de caracterul *Mate-Killer* la baza căruia stă prezența în citoplasmă a unor particule desemnate *mu*. Celulele care au în citoplasmă particule *mu* determină moartea partenerului de conjugare dacă acesta nu posedă particule *mu*. Particulele *mu* conțin ADN, ARN, proteine și alte substanțe, ceea ce indică natura lor bacteriană, nu virală. Dar menținerea lor în citoplasmă este dependentă de prezența unei alte particule citoplasmatică numită *metagon*, produs al unor gene denumite M_1 și M_2 . Metagonul reprezintă de fapt ARNm, produs de transcriere al genelor M_1 și M_2 . Pe de altă parte nu este exclusă posibilitatea ca acest metagon să fie un virus ARN.

3.6. SEX-RATIO MATERN ȘI SENSIBILITATEA FAȚĂ DE CO_2 LA DROSOPHILA

La drosofilă au fost descoperite unele femele care dau descendenți, care sînt predominant sau exclusiv femeli (linii fără masculi). Această particularitate s-a numit *sex-ratio matern*. Cînd rezultă ocazional și masculi de la asemenea femele, aceștia încrucișați cu femele normale dau în descendență un raport egal de sexe 50% ♀ și 50% ♂ ceea ce este un indiciu că acest caracter sex-ratio matern se transmite doar pe linie maternă.

Agentul responsabil determină moartea ovulelor fecundate de spermatozoizi Y. Cercetări electronomicroscopice au evidențiat prezența, în celulele femelelor sex-ratio matern, a spirochetelor din genul *Treponema* agent infecțios care are un comportament asemănător particulelor Kappa de la *Parameci*. Dar caracterul ucigător are la bază o infecție virală, dovedindu-se electronomicroscopic prezența în spirochete de *dezoxiribovirusuri*, fapt susținut și de existența caracterului sex-ratio matern

la femele de drosofilă care nu prezintă spirochete. Acest caracter sex-ratio matern de la *Drosophila*, condiționat extranuclear, nu trebuie confundat cu un alt caracter sex-ratio determinat cromozomal și bazat pe prezența a trei inversii caracteristice la cromozomul X de la masculi fiind un caracter condiționat deci de masculi în care se produc numai descendenți femeli. Tot la *Drosophila* s-a descris în un alt caz de endosimbioză bazat pe prezența în citoplasmă a unui factor *sigma* ce reprezintă un virus infecțios ADN. Acest dezoxiribovirus determină paralizia mușchilor când acestea sînt expuse la concentrații de CO_2 care în mod normal nu afectează tipul normal. Din încrucișarea unei femele sensibile la CO_2 cu un mascul normal rezultă o descendență în care toți masculi sînt sensibili la CO_2 . Când femele normale sînt fecundate de masculi sensibili la CO_2 , descendența este aproape în totalitate normală. Aceasta înseamnă că este vorba de o transmitere pe linie maternă a caracterului de sensibilitate la CO_2 . Prin încrucișări repetate cu masculi normali s-a reușit înlocuirea tuturor cromozomilor din setul matern inițial, cu cromozomi de origine paternă, demonstrîndu-se că descendența în toate cazurile era sensibilă la CO_2 , ceea ce înseamnă că acest caracter este moștenit nu pe cale cromozomal nucleară și pe cale extra-nucleară, citoplasmatică.

La *D. paulistorum* s-a descris sterilitatea mascul-citoplasmatică la anumiți hibridi interraciali și determinanții acestei androsterilități au fost transmiși prin citoplasma ovulului.

Androsterilitatea citoplasmatică la insecte prezintă interes practic medical. Pe calea sa pot fi combătute populațiile de țînțari purtătoare ale agentului malariei. Acest fenomen ar putea aplica unele cazuri de sterilitate secundară la om, iar unele situații în care cuplurile produc numai fete ar putea fi explicate prin intervenția unor fenomene de tip sex-ratio matern.

Capitolul VIII

REGLAREA ACTIVITĂȚII GENICE

1. INTRODUCERE

Mecanismele reglării activității genelor, ale diferențierii celulare și dezvoltării sînt extrem de complexe și reprezintă unele dintre cele mai interesante probleme ale biologiei.

Reglarea activității genelor (intrarea lor în funcțiune după un program riguros controlat, după un ceasornic biologic care funcționează cu mare exactitate la nivelul molecular și celular al organismului) este realizată atît la procariote cît și la eucariote.

La *E. coli*, în timpul creșterii pe medii nutritive complete, optime, sînt transcrise (deci funcționează) marea majoritate a genelor, pe cînd la *Bacillus subtilis*, funcționale în aceleași condiții sînt circa 60% dintre gene. La eucariote procentele sînt mai mici. Dacă se ia drept index de transcriere, pufele cromozomilor politeni, în timpul vieții unei celule date, doar 20% din genele nucleare sînt funcționale. Dacă se ia drept index de transcriere buclele cromozomilor *lampbrush* de la amfibieni, numai circa 5% dintre gene sînt active. În alte tipuri de celule s-a stabilit că procentul de gene funcționale variază între 6 și 32% din totalul genelor genomului nuclear.

Ca o concluzie generală desprinsă din studiul reglării activității genelor apare faptul că dezvoltarea și diferențierea unei celule este legată de transcrierea diferențiată a informației sale genetice. Întreaga dezvoltare ontogenetică a organismului este o complicată epigeneză, în care are loc formarea de novo a țesuturilor și organelor, acestea nefiind preformate.

Existența unui program de funcționare a genelor, respectiv a unui mecanism de reglare a activității lor este mai ușor decelabilă la eucariote, caracterizate de diferențieri celulare speci-

fiice care nu pot fi explicate decît admițînd că unele gene funcționează permanent pe cînd altele funcționează temporar, în locuri specifice și în momente specifice din ontogeneză.

Există o eșalonare în timp a funcționării genelor. De exemplu la om marea majoritate a genelor intră în funcțiune din primele momente ale vieții pe cînd altele, cum ar fi genele care determină chelia, încep să funcționeze după vîrsta de 25 ani.

Toate celulele unui organism eucariot, derivînd prin diviziuni mitotice succesive ale celulei ou sau zigot, moștenesc un același număr de cromozomi sau mai exact o aceeași informație ereditară. Dar aceste celule sînt de diferite tipuri, la om ajungînd la peste 100, diferențiîndu-se net structural și funcțional unele de altele. Unele încetează a se mai divide și se specializează în engramare (neuronii), altele proliferază intens cum sînt celulele liniei hematopoetice sau celulele epiteliale.

Dacă considerăm gena sau genele care dirijează sinteza pigmentului irisului la om, acestea au fost distribuite în toate celulele corpului, chiar de la primele diviziuni ale zigotului. Dar ele nu vor fi exprimate decît la nivelul celulelor irisului și atunci acțiunea lor va trebui să fie blocată, pe o cale sau alta, la nivelul tuturor celorlalte celule, în care nu se exprimă. Existența unui mecanism de control a fost admisă pentru mai multe considerente:

- 1) numărul de molecule ale unei proteine, la un anumit moment într-o celulă dată este variabil în limite mari;

- 2) în cadrul relației $ADN \rightarrow ARN \rightarrow Proteină$, ADN-ul imprimă aspectul calitativ al sintezei proteinice;

- 3) aspectul cantitativ al acesteia este determinat pe de o parte de un mecanism intern de modulare iar pe de altă parte de constituția chimică a mediului extern.

Din totalul celor 2000—4000 catene polipeptidice diferite pe care le sintetizează o celulă bacteriană și care reprezintă capacitatea de codificare a cromozomului bacterian, la un moment dat din ciclul celular unele se află în cantitate mai mare, pe cînd altele se află în cantitate mai mică. Proteinele structurale ale peretelui celular, membranei celulare și ribozomilor se află nu numai în cantitate mare, dar și constantă. Alte proteine, mai ales cele cu activități enzimatică, sînt variabile cantitativ în diferitele momente ale ciclului celular. La *E. coli* numărul de molecule proteinice variază de la 10 molecule pe celulă pentru unele tipuri de proteine pînă la 500 000 molecule pe celulă pentru alte tipuri de proteine. Proteinele ribozomale

sînt reprezentate de aproape 100 000 de molecule pe celulă. Aceasta denotă clar că *E. coli* nu sintetizează în cantitate egală toate proteinele codificate în genomul său, ci diferențiat, în funcție de necesitățile celulei la un moment dat. Se realizează astfel o funcționare armonioasă și economică a celulei. Cu alte cuvinte funcționarea diferitelor gene este strict coordonată și controlată. Cele cu activități enzimatică, sînt variabile cantitativ în diferitele momente ale ciclului celular.

În sinteza proteinelor se remarcă două tipuri de control. Un tip de control dependent de condițiile de mediu care determină activarea unei anumite părți din mesajul genetic, nefolosită pînă în acel moment este numit *adaptiv*. El face să fie sintetizate la un moment dat enzimele necesare celulei în acel moment (enzime adaptive) și să fie blocată (represată) sinteza celor care nu sînt necesare în acel moment (Goodenough și Levine, 1974).

Un al doilea tip de control aflat sub activitatea directă a determinantelor genetice este indirect influențat de condițiile de mediu și s-a numit *control programat*. El determină funcționarea constantă a genelor făcînd să fie sintetizate proteine (enzime) în cantitate aproape constantă, în tot timpul vieții. Asemenea enzime (proteine) se numesc constitutive.

Controlul programat stă la baza diferențierii celulare, mai ales la eucariote, determinînd o eșalonare în timp a sintezei diferitelor proteine, deși în fiecare celulă există informația genetică pentru sinteza tuturor proteinelor.

Controlul adaptiv intră în logica funcționării economice, eficiente a sistemelor biologice: se sintetizează acea substanță și în acea cantitate care sînt necesare la un moment dat celulei.

Rezultă că unele gene sînt *constitutive* pe cînd altele sînt *reglate*. Cele constitutive sînt exprimate continuu, produsul lor aflîndu-se invariabil în celulă, în concentrație constantă, indiferent de condițiile de creștere. Expresia unei gene reglate însă este subiect de modificare sub acțiunea unor stimuli chimici care apar și dispar din celulă. Controlul genetic este exercitat însă permanent asupra tuturor genelor, indiferent dacă sînt constitutive sau reglate. Enzimele constitutive, cum sînt cele legate de metabolismul glucozei — enzimele glicolizei — sînt necesare în permanență, dat fiind faptul că glucoza joacă un rol central în metabolismul bacterian.

Enzimele celor mai multe căi metabolice (ale lactozei, arabinozei, galactozei, pentru sinteza aminoacizilor, a purinelor, pirimidinelor etc.) sînt necesare numai atunci cînd este prezent

substratul lor. Asemenea enzime sînt specificate de gene reglate. Asupra genelor reglate este exercitat un control la nivelul transcrierii sau la nivelul traducerii. Astfel, gena reglată va fi transcrisă numai atunci cînd este necesară transcrierea sa. Traducerea transcriptului (ARN_m) unei asemenea gene nu poate avea loc fără intervenția unor factori din mediul celular care, asociați cu ribozomii facilitează traducerea mesajului genetic.

Genele procariote sînt reglate îndeosebi la nivelul transcrierilor prin intermediul unor elemente de control care la bacterii și fagii ADN reprezintă porțiunii din cromozomi, adiacente genei sau genelor pe care le guvernează și care s-au numit promotor și operator.

2. REGLAREA ACTIVITĂȚII GENICE LA PROCARIOTE

Bacteriile se caracterizează prin diauxie. Aceasta înseamnă că o bacterie crescută pe mediu de glucoză și lactoză, folosește preferențial glucoza pînă ce o epuizează, iar după o perioadă de stagnare începe din nou să crească, dar de această dată folosește ca sursă de carbon lactoza. Lactoza nu poate fi folosită direct ca sursă de carbon decît numai dacă este scindată prin activitatea enzimei β -galactozidază în galactoză și glucoză. Cînd bacteria *E. coli* este crescută pe un mediu lipsit de lactoză, în celulele sale se află doar cîte o moleculă de β -galactozidază. Cînd însă bacteria este crescută pe un mediu a cărui singură sursă de carbon este lactoza, celulele conțin circa 3000 de molecule de enzimă β -galactozidază. Unele tulpini superproducătoare care conțin probabil mai multe copii ale genei pentru β -galactozidază produc mult mai multe molecule de enzimă. Este însă vorba de o suprasinteză realizată în dauna altor proteine, astfel că asemenea tulpini cresc greu și nu fac față competiției cu celulele normale care realizează o sinteză proteinică echilibrată. Lactoza apare că induce sinteza enzimei specifice degradării sale metabolice, condiționînd transcrierea genei sau genelor care dirijează sinteza acesteia. Din această cauză lactoza a fost numită *inductor*, iar enzima ce o scindează — β -galactozidază — o enzimă inductibilă. β -galactozidaza este o enzimă tetramerică alcătuită din patru catene polipeptidice identice, fiecare avînd cîte o greutate moleculară de 134 000 daltoni. Ea este sintetizată sub direcția genei structurale simbolizată

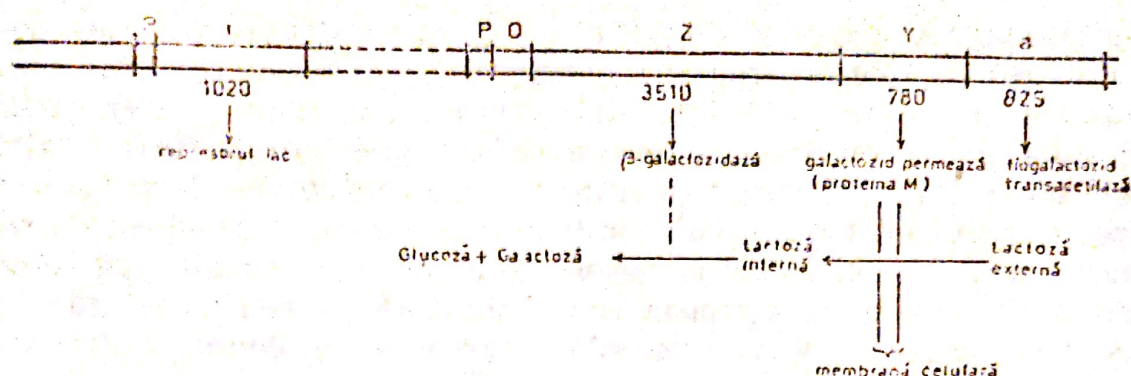


Fig. 69. Organizarea operonului *lac*. Cifrele indică numărul de perechi de nucleotide (după Watson, 1970).

„Z“. Este o enzimă catabolică care desface lactoza (ce nu poate fi folosită ca atare de celula bacteriană) în galactoză și glucoză. Dar în metabolismul lactozei mai intervin și alte enzime. Astfel, pătrunderea lactozei în celula bacteriană din mediul extracelular este înlesnită de enzima *galactozid-permeaza*, numită încă *proteina M* (fig. 69). Ea este localizată în membrana celulei bacteriene și este specificată de gena „Y“. Nu se cunoaște rolul exact pe care o altă enzimă numită *thiogalactozidtransacetilaza* îl are în celulă în metabolizarea lactozei; se admite că ea aparține grupului de enzime care intervin în această cale metabolică. Gena care specifică enzima *thiogalactozidtransacetilaza* a fost notată cu „a⁺“, respectiv A. Genele *z⁺*, *y⁺*, și *a⁺* se numesc gene structurale și deoarece specifică enzime care intervin în același lanț metabolic formează așa-numitul operon, reprezentând o secvență de nucleotide adiacente care cuprinde informația genetică a mai multor gene (mesaj poligenic) transcrisă de o catenă unică de ARNm. Cu alte cuvinte, *operonul reprezintă unitate de transcriere și de reglare genetică*. Dar la nivelul unei molecule policistronice de ARNm nu are loc o traducere cu o intensitate egală a fiecăruia dintre mesaje. În cazul considerat, enzimele β -galactozidaza, galactozid-permeaza și tiogalactozidtransacetilaza sînt sintetizate în proporțiile: 1 la 1/2 la 1/5.

La procariote operonul cuprinde un număr definit de gene structurale interdependente (înrudite), care dirijează sinteza unor enzime ce intervin în aceeași cale metabolică sau a unor proteine structurale interdependente.

Adiacent primei gene structurale se află o regiune sau *sit de reglare* care a fost numită *operator*, de care depinde funcționarea sau nefuncționarea genelor structurale. Starea de

funcționare sau de nefuncționare a genelor structurale este dependentă de neasocierea sau asocierea specifică a regiunii operatorie cu o substanță numită *represor*, a cărui sinteză este dirijată de o genă localizată în afara operonului, într-o altă regiune a ADN și care s-a numit *genă reglatoare*. Neasocierea operatorului cu represorul condiționează starea „deschisă” a sa, stare care permite transcrierea genelor structurale, pe când asocierea operator-represor condiționează starea „închisă” a acestuia, stare care nu permite transcrierea genelor structurale (fig. 70 A).

Adiacent regiunii operatorie în fața acesteia în raport cu genele structurale se află regiunea la care se atașează ARN polimeraza în vederea transcrierii genelor structurale. Această regiune a fost numită *promotor*.

Promotorul reprezintă o secvență de baze recunoscută în mod specific de către subunitatea σ a ARN polimerazei. Legarea ARN polimerazei la promotor inițiază transcrierea genelor structurale dar pentru aceasta, regiunea operatorie trebuie să fie în stare „deschisă”. Proprietățile de inițiere ale promotorilor genelor structurale constitutive sînt modificate doar prin mutație pe cînd cele ale promotorilor genelor reglate sînt modificate prin schimbări temporare ale mediului celular care fac ca starea operatorului să fie „închisă” sau „deschisă”. Astfel, operatorul, localizat între promotor și genele structurale determină dacă o ARN polimerează este capabilă de a progresa din locul său de atașare la promotor spre genele structurale.

Sînt și gene singure care nu sînt încadrate în operoni dar sînt și ele reglate, posedînd o regiune promotoare și o regiune operatorie, plasate înaintea secvenței sale codificatoare. Dar genele încadrate în operon se deosebesc de asemenea gene prin faptul că sînt transcrise într-o singură moleculă de ARNm care s-a numit *mesager poligenic* sau *policistronic*, pornind de la o singură regiune promotoare. Mesagerul poligenic conține mai multe semnale „start” ale traducerii reprezentate prin codonul AUG care, prin atașarea la ele a diversilor ribozomi are loc traducerea simultană a tuturor segmentelor mesagerului. În felul acesta este posibil ca să fie sintetizate simultan toate enzimele cerute de calea metabolică considerată și a căror acțiune trebuie să fie sincronizată, cooperantă. Transcrierea genelor din operon este un mijloc eficient de sinteză coordonată, a enzimelor ce intervin în aceeași cale metabolică, chiar dacă nu toate aceste enzime sînt sintetizate în cantitate egală, căci unii codoni start AUG din ARNm poligenic sînt mai activi în

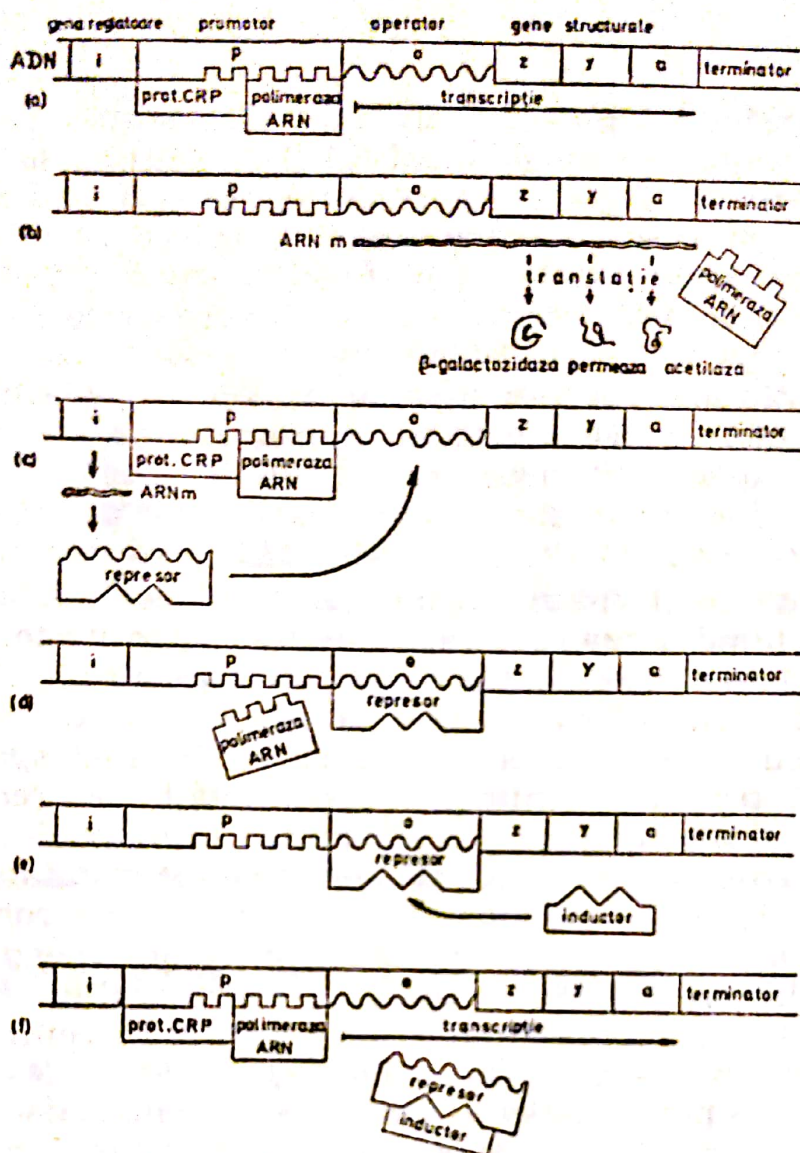


Fig. 70. A. Schema reglării sintezei enzimelor prin controlul transcrierii. (a). În absența represorului, transcrierea operonului *lac* este realizată de către ARN polimerază care se atașează la regiunea promotoare (p) în prezența proteinei CRP (atașarea ARN polimerazei este ea însăși controlată de un al doilea *sit* de pe promotor care este implicat în legarea proteinei CRP — proteină receptoare pentru AMP ciclic numită încă proteină CAP — proteină activatoare catabolică) ARN polimeraza nu se poate atașa la promotor fără această CRP care reprezintă un reglator pozitiv căci amplifică funcția mai curînd decît a o repressa. Atașarea CRP la promotor este dependentă de prezența cAMP-adenozin ciclic monofosfat și începe să transcrie operatorul pînă ce ajunge la secvența terminatorului. (b). Traducerea ARNm, *lac* duce la formarea enzimelor implicate în metabolizarea lactozei. (c). Sinteza proteinei represoare *lac* are loc prin traducerea unui ARNm care este transcris separat de pe gena reglatoare *i*. (d). Atașarea proteinei represoare la regiunea operatoră blochează transcrierea operonului *lac* de către ARN polimerază sau chiar a atașării sale la regiunea promotoare. (e, f). Un inductor corespunzător se atașează la un *sit* specific pe represorul alosteric (proteinele alosterice își pot schimba forma prin interacțiunea cu o anumită moleculă: represorul *lac* are două situri, unul de legare la operatorul *lac* iar altul la inductor) determinînd modificarea formei sale, detașîndu-se de pe operator și permițînd astfel transcrierea.

inițierea traducerii pe cînd alții sînt mai puțin activi. Astfel se explică de ce în cadrul funcționării operonului lactozei (lac) de *E.coli* enzima β -galactozidaza este de 3—5 ori mai intens sintetizată comparativ cu tiogalactozidtransacetilaza. Nu același lucru se întîmplă însă în cazul funcționării operonilor triptofanului și galactozei tot la *E.coli* în care are loc o sinteză echimolară de enzime.

O mutație apărută într-o regiune dată a operonului proximală promotorului va afecta nu numai sinteza enzimei specificată de prima genă structurală ci și pe a celorlalte enzime specificate de celelalte gene. Aceasta este proprietatea de polaritate care caracterizează operonul bacterian.

În reglarea activității genice elementul cheie este proteina reglatoare numită *represor* care este de fapt o proteină alosterică care posedă două situri. Unul din aceste situri prezintă afinitate pentru întreaga secvență de nucleotide a locusului operator, cu care represorul se asociază în mod specific, iar celălalt sit prezintă afinitate și proprietăți de recunoaștere pentru molecula inductoare. Combinarea represorului și inductorului la acest al doilea sit alosteric reduce afinitatea primului sit de legare la operator în urma modificării conformaționale a proteinei represoare și astfel operatorul poate fi eliberat de represor. Legarea specifică a represorului de operator are la bază probabil o anumită specificitate în configurația sa tridimensională. Dacă la proteina reglatoare se leagă o altă moleculă care poate fi reprezentată de un zahăr, un aminoacid sau o nucleotidă, aceasta schimbă capacitatea moleculei reglatoare de a interacționa cu operatorul. O asemenea moleculă care schimbă proprietățile de legare ale proteinei reglatoare se numește *moleculă efectoare*. Dacă molecula efectoare apare în mediu intracelular ea se va lega de reglator și astfel îl va smulge de pe operator permițînd exprimarea operonului. Toate acestea asigură sinteza unei cantități de proteine specifice care este corespunzătoare nevoilor celulei la un moment dat.

Cea mai bine înțeleasă este baza moleculară a mecanismului reglării operonului lactozei de la *Escherichia coli* care a fost numit și *operonul lac*. Încă din anul 1950 Jacob și Monod au avut ideea despre existența unui reglaj genetic în care o proteină reglatoare se leagă la o regiune specializată a genomului, inhibînd expresia unor gene, atîta vreme cît efectatorul (inductorul) nu este prezent în celulă. Cînd însă apar molecule efectoare în celulă, această regiune este deblocată în urma unei interacțiuni cu proteina reglatoare.

Cei doi autori au folosit două mutante de *E. Coli* — mutanta A sintetiza o enzimă constitutivă pentru glucoză și o enzimă adaptativă pentru lactoză, pe când mutanta B sintetiza o enzimă constitutivă pentru lactoză și o enzimă adaptativă pentru glucoză. Prin conjugarea celor două tulpini mutante se realizează recombinația genetică prin care rezultă tulpini recombinante în care trebuiau să existe genele constitutive ale ambilor genitori. S-a constatat că asemenea recombinanți nu pot însă fermenta lactoza din cauza absenței enzimelor corespunzătoare. Aceasta era dovada experimentală că în citoplasma mutantei A există un represor care blochează funcționarea genei ce dirijează sinteza enzimei β -galactozidază.

În anul 1961 cei doi autori au prezentat date experimentale sigure care au demonstrat existența reală a unui mecanism de reglaj genetic, operabil în dirijarea aspectelor cantitative ale funcției heterocatalitice a genei.

3. REGLAREA OPERONULUI LAC LA E.COLI

3.1. ASPECTE GENETICE ALE REGLĂRII OPERONULUI LAC

Operonul lac este un operon inductibil. El este în mod normal represat, atunci când în mediul celular nu se află lactoza. Acest fapt este dovedit prin cantitatea extrem de redusă a enzimei β -galactozidazei reprezentând 1/1000 din nivelul cantitativ al enzimei înregistrat atunci când în mediul celular apare lactoza. Se admite că lactoza induce operonul lac, fiind deci un inductor. Are loc o sinteză de novo a β -galactozidazei și nu o activare a moleculelor preexistente.

Promotorul îndeplinește două funcții. El constituie loc de atașare a ARN polimerazei inițiind sinteza ARNm și reprezintă elementul care stabilește nivelul maxim al transcrierii mesajului.

Promotorul lac se compune din două regiuni specifice. Una din aceste regiuni conține o repetiție de cinci perechi de baze care servește ca sit de recunoaștere pentru ARN polimerază (transcriptază). Regiunea de recunoaștere mai conține o secvență bogată în AT, flancată de secvențe bogate în GC. Se crede că ARN-polimeraza se leagă strâns la secvența bogată în AT numai când această secvență este denaturată. Spre deosebire de

promotorul genei ARNt pentru tirozină, promotorul *lac* nu prezintă în această regiune secvențe simetrice de baze de tip palindrom. A doua regiune a promotorului *lac* prezintă simetrie de baze de tip palindrom care dă posibilitatea formării a două bucle *hairpin* (cu împerecheri intracatenare) care se crede că facilitează recunoașterea acestei regiuni a promotorului de către proteina de activare catabolică a genei (CAP) care este un dimer globulinic. Pentru ca CAP să fie legată la această regiune buclată a promotorului, este necesară activarea sa de către AMP ciclic (cAMP) care acționează în calitate de efector. Complexul cAMP-CAP se crede că destabilizează regiunea adiacentă bogată în GC, permițând astfel și denaturarea sitului de legare a transcriptazei bogat în AT și implicit legarea transcriptazei. Legarea transcriptazei la promotor este influențată de concentrația intracelulară de glucoză. Când aceasta este mare, nivelul cAMP scade, ceea ce are ca urmare blocarea legării CAP la promotor. În consecință legarea transcriptazei la promotor este împiedicată sau este slabă, transcrierea avînd loc la un nivel scăzut. Acesta este efectul glucozei sau de represie a catabolizării.

Regiunea promotoare a operonului *lac* se află sub un control pozitiv, ceea ce înseamnă că atunci cînd promotorul se asociază cu proteina sa specifică CAP este stimulată transcrierea operonului. Regiunea operatorie se află sub un control negativ ceea ce înseamnă că atunci cînd aceasta interacționează cu proteina sa reglatoare (represorul) transcrierea operonului este represată. Proteina reglatoare a operatorului operonului *lac* se numește represor *lac*. Această proteină este specificată de gena „i⁺” localizată în afara operonului *lac*, pe un alt segment de ADN.

În absența lactozei, represorul *lac* este atașat la operatorul *lac* care acționează ca un comutator chimic și îi conferă starea „închisă” ce face ca genele structurale ale operonului *lac* să nu fie transcrise și operonul să fie blocat. La pătrunderea lactozei în celulă, lactoza acționează ca inductor, se leagă la represorul *lac*, îi modifică afinitatea pentru operatorul *lac*, acesta trece în starea „deschisă” și atunci este permisă transcrierea genelor structurale. Operonul *lac* devine funcțional și sînt sintetizate cele trei enzime.

Variația vitezei de sinteză proteinică se corelează cel puțin în parte cu variația numărului de molecule ARNm. În timpul sintezei maxime a β -galactozidazei în celulă se află pînă la 50 molecule de ARNm ce poartă mesajul genetic pentru această

enzimă comparativ cu o medie de mai puțin o moleculă ARNm pentru β -galactozidază înregistrată în celulele fără lactoză și inactive în sinteza enzimei.

Adevăratul inductor al operonului lac este *alolactoza* care ia naștere din transformarea — sub acțiunea moleculelor pre-existente de β -galactozidaza — a primelor molecule de lactoză pătrunse în celulă.

Operatorul nu specifică un produs funcțional și chiar dacă este transcris el nu este tradus (fig. 70 B). Acest fapt este demonstrat de lipsa sensibilității mutantelor O^c la temperatură și comportamentul lor diferit de acela al mutațiilor unor gene care specifică produși funcționali. Astfel, mutațiile O^c nu sînt repesate (anulate) de sușele supresoare *amber* (vezi mutațiile). Faptul că operatorul poate fi transcris în ARNm a fost dove-

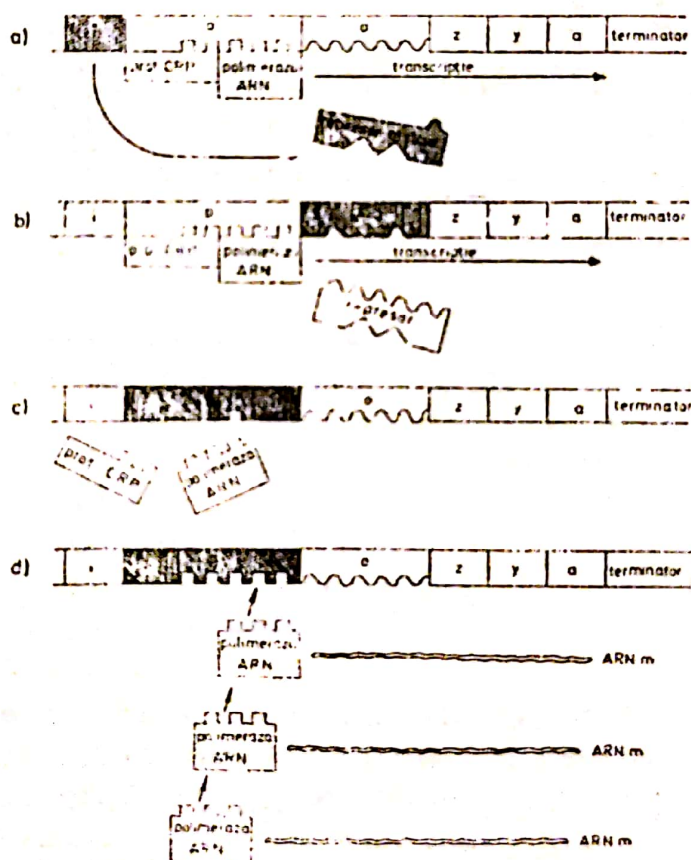


Fig. 70. B. Efectele variațiilor mutației asupra reglării operonului lac. (a). Mutația în gena reglatoare *i* duce la sinteza unui represor incapabil de a se atașa la regiunea operatorie și determină o sinteză de tip constitutiv a enzimelor. (b). Mutația în regiunea operatorie împiedică legarea represorului ducând de asemenea la sinteza enzimatică de tip constitutiv. (c). Mutația sau deleția în regiunea promotorului duce la blocarea atașării ARN polimerazei împiedicând astfel transcrierea operonului lac (d). Mutația în promotor poate controla rata de transcriere a operonului „ducând la o mai rapidă atașare a ARN polimerazei și crescând numărul de molecule ARNm sintetizate. (după Strickberger, 1976).

dit de existența multor molecule de ARNm care nu încep cu codonii de inițiere AUG sau GUG. Astfel, operatorul nu este o genă, el reprezintă numai o secvență specifică de nucleotide specializată spre a interacționa cu represorul și a stabili starea de funcționare sau nefuncționare a operonului. Astfel cele trei gene structurale ale operonului lac au două situri interdependente de reglare promotorul și operatorul.

Mutația regiunii promotoare afectează transcrierea genelor structurale, determinând scăderea afinității sale pentru ARN polimerază. Mutațiile în promotorul lac au caracterul de *cisdominanță*, dat fiind faptul că sînt afectate doar genele structurale care sînt adiacente acestei regiuni promotoare.

Promotorul este o regiune distinctă de operator (fig. 71).

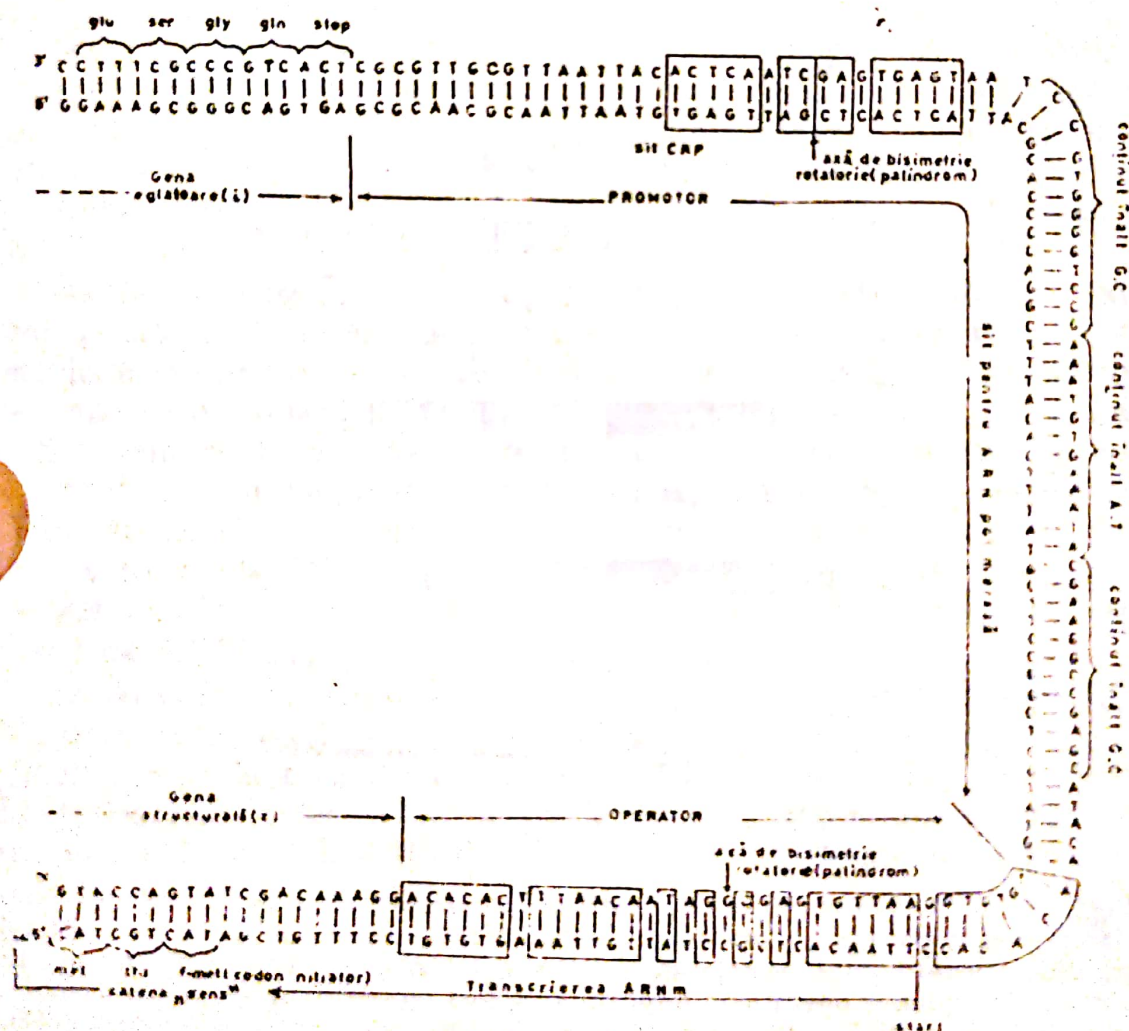


Fig. 71. Secvențele de nucleotide de la nivelul regiunii operatorie și promotoare incluzînd și porțiunea terminală a genei reglatoare (i) și începutul primei gene structurale (z) a operonului lac de *E. coli*. Porțiunile încadrate reprezintă secvențe cu bisimetrie rotatorie (palindroame).

Acest fapt a fost demonstrat prin analiza unei tulpini de *E.coli* care a suferit o deleție în cromozom la nivelul segmentului o și z . Asemenea tulpină a prezentat o sinteză de tip constitutiv a enzimei specificată de gena „ a ” ceea ce arată că deși operatorul a fost eliminat prin deleție promotorul rămâne funcțional fiind o regiune de-sine-stătătoare.

Promotorul îndeplinește două funcții, de inițiere a sintezei ARNm și de stabilire a nivelului maxim al transcrierii mesajului.

3.2. DEMONSTRAREA REALITĂȚII REPRESORULUI LAC PRODUSUL GENEI LAC i^+)

A fost realizată de W. Gilbert și B. Müller-Hill în 1967. Există o substanță numită isopropil β -D-tiogalactozid (IPTG) care induce experimental operonul *lac* în celulele z^- sau y^- . Din extracte de *E. coli* a fost izolată o proteină care se unește cu molecule de IPTG marcate radioactiv. O asemenea proteină nu a putut fi izolată din extractele de la sușe i^- de *E.coli* sau de la sușele i^s .

Represorul este produs în cantitate mare (pînă la 0,5% din cantitatea totală de proteină) la sușele i^q și de la asemenea sușe a fost izolat represorul care s-a dovedit a fi o moleculă tetrameră cu o GM = 150 000 daltoni, cele patru subunități ale proteinei fiind identice, avînd o GM = 38 000 daltoni, fiecare putînd lega o moleculă de IPTG. Fiecare din cele patru catene polipeptidice conține 250 aminoacizi. De asemenea proteina represoare nu a putut fi detectată sau izolată de la mutanți genic constitutivi *lac i*.

Fragmente de ADN de *E. coli* de la tipul sălbatic au fost incubate împreună cu represorul marcat radioactiv. Prin ultracentrifugare în gradient de densitate a fost izolată a fracțiune în care ADN este cuplat cu represorul marcat. O asemenea fracție nu a putut fi remarcată atunci cînd ADN-ul a fost extras de la sușe O^c de *E.coli*. Astfel s-a putut trage concluzia că aceste complexe ADN-proteină reprezintă complexe operator-represor. Prin digestia enzimatică a proteinei s-a putut izola astfel ADN corespunzător operatorului. În momentul în care a fost izolat represorul *lac* s-a putut supune unui test critic ipoteza Jacob-Monod, după care situl operator *lac* este ținta sa. Bacteriile au fost crescute pe mediu cu ^{35}S spre a fi marcate

proteinele și implicit represorul *lac*. S-a extras represorul *lac* marcat radioactiv și acesta a fost prezentat la variate molecule de ADN în prezența sau absența inductorului IPTG. Amestecurile de reacție *in vitro* au fost apoi supuse sedimentării prin ultracentrifugare în gradienti de densitate de sucroză spre a vedea dacă vreo moleculă de proteină represoare radioactivă (care în stare liberă sedimentează de 5 ori mai încet decât moleculele mari de ADN folosite în experiență) s-a atașat la molecule de ADN și astfel vor sedimenta cu aceeași înaltă viteză ca aceste molecule de ADN. Rezultatele acestei experiențe au fost următoarele:

1) represorul nu se atașează la moleculele de ADN dacă acestea sînt lipsite de toate genele operonului *lac*;

2) represorul se atașează la moleculele de ADN ce poartă genele operonului *lac*, numai dacă IPTG nu a fost prezent în amestecul de reacție *in vitro*;

3) represorul nu se atașează la moleculele de ADN care poartă genele operonului *lac*, dacă operonul este de tip mutant *lac O^c* (operator constitutiv).

Aceste rezultate au confirmat direct propunerea inițială după care reglarea funcțională a genelor *lac* este asigurată de o interacțiune sensibilă la inductor dintre proteina represoare și locusul operator.

S-au efectuat numeroase experiențe *in vitro* privind interacțiunea dintre represorul *lac* și ADN purificat al operatorului *lac*. Faptul cel mai spectaculos a fost atunci cînd complexe represor-operator s-au amestecat cu IPTG, complexe s-au scindat rezultînd ADN liber și molecule represoare cuplate cu IPTG demonstrînd că interacțiunea represor-efector-operator este așa cum au prezis-o Jacob și Monod (1961).

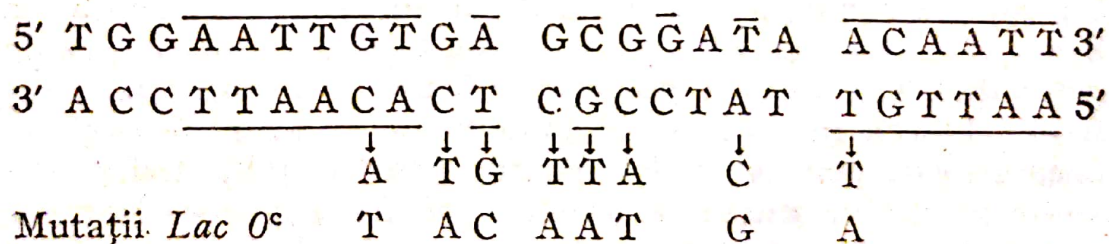
Sinteza represorului este reglată de un promotor al genei represoare, nu de represori, căci altfel ar apare un număr infinit de represori diferiți care să-și reprime unul altuia sinteza. Proteina represoare nu are un reglaj genetic asemănător proteinelor structurale sau enzimelor. Represorul împiedică numai inițierea sintezei ARN_m și nu poate afecta creșterea catenei ARN după ce aceasta a fost inițiată. Starea funcțională a represorilor este determinată de inductori și corepresori. Molecula represorului reprezentînd o moleculă alosterică are o porțiune care prezintă o conformație complementară cu o porțiune a inductorului sau corepresorului corespunzător între care apar legături secundare slabe de tipul legăturilor van der Waals, de hidrogen sau ionice care se formează și se scindează rapid fă-

cînd posibilă o rapidă adaptare a stării represorului: represor corepresor $\rightarrow$ represor activ; represor + inductor $\rightarrow$ represor inactiv.

Dacă un aminoacid, acționând în calitate de corepresor, se leagă la represor, în mod normal inactiv, îl face activ și atunci este blocată sinteza enzimelor ce participă în diversele etape din calea metabolică de sinteză a aceluia aminoacid. Pe de altă parte un represor activ cuplat cu inductorul (lactoza) face ca el să devină inactiv și să permită sinteza enzimelor specifice.

După demonstrarea rolului locusului *lac O* intuit de Jacob și Monod, Gilbert și-a propus să izoleze segmentul de ADN care conține acest locus. Pentru aceasta, complexe represor-operator formate prin amestecarea represorului cu ADN extras de la fagi transductanți *lac* au fost supuse acțiunii DN-azei care a digerat ADN necomplexat cu represorul, acesta protejind segmentul corespunzător operatorului cu care s-a asociat specific, față de acțiunea DN-azei. S-a izolat astfel un fragment scurt de ADN dublu-catenar de numai 24 perechi de baze lungime care a fost supus secvențierii. S-a demonstrat că locusul operator conține o secvență de 21 nucleotide cu simetrie rotatorie (palindromică).

Secvența de baze azotate a operatorului lac și schimbările de baze care apar la 8 mutanți operator constitutivi (*Lac O^c*) sînt prezentate la figura de mai jos, din care se vede că alterarea unei singure perechi de baze în locusul *lac O* blochează eficient legarea represorului și astfel schimbă operonul din starea sa normală inductibilă într-o stare operator-constitutivă.



vența cu care moleculele de ARN polimerază se atașează la acesta și determină rata maximă la care o genă dată poate fi transcrisă în ARNm. Pentru unele gene, cum ar fi *lac I*, rata maximă este totdeauna rata reală. Pentru alte gene însă, cum sînt genele *lac z'*, *y'*, *a'*, rata maximă este atinsă numai atunci cînd locusul lor operator este în stare deschisă, adică eliberat de represor. Promotorul genei reglatoare *lac I* oferă un control fix asupra ratei expresiei genice, pe cînd alți promotori cum este cel al operonului *lac*, pentru genele *z*⁺, *y*⁺, *a*⁺ oferă un control variabil al expresiei genelor *lac*, depinzînd de sistemul de interacțiune represor-operator (Stent și Calendar, 1978).

4. REPRESIA CATABOLICĂ

Cînd bacteria *E.coli* este crescută pe mediu cu glucoză ca sursă de carbon și energie, bacteria nu sintetizează enzimele ce intervin în metabolizarea (fermentarea) lactozei. Dacă *E.coli* este crescută pe mediu mixt (glucoză și lactoză) timpul său de generație este la început 20 min, caracteristic creșterii pe mediu cu glucoză, după care creșterea este întreruptă pentru 20 min, apoi creșterea este reluată, dar viteza de creștere corespunde acum unui timp de generație de 80 minute caracteristic creșterii pe mediu cu lactoză. Creșterea încetează temporar cînd glucoza a fost consumată în totalitate, moment în care începe inducția enzimelor lactozei. Cînd în mediul în care este crescută *E.coli* este adăugată glucoza, este inhibată sinteza enzimelor implicate în metabolizarea zaharurilor precum lactoza, maltoza, arabinoza și galactoza. Fenomenul se numește represie catabolică sau efectul glucozei. Efectul glucozei este esențial în elucidarea mecanismului inducției enzimelor lactozei. Glucoza nu este prin ea însăși agentul direct al inhibiției, fapt dovedit de dublul mutant al genelor *fgi* (fosfo-glucozo-izomeraza) și *zwf* (glucoza-6-fosfat-dehidrogenaza) de *E.coli* care nu poate converti glucoza-6-fosfatul în intermediarul catabolic imediat următor din calea metabolică glicolitică și nu poate utiliza în consecință nici glucoza, nici lactoza ca sursă de carbon și energie. Dar acest dublu-mutant crește pe glicerol și astfel inducția β -galactozidazei cu IPTG poate avea loc indiferent dacă glucoza este sau nu prezentă în mediul de cultură. Inhibitorul activ în realizarea „efectului glucozei” la *E.coli* normală s-a dovedit a

fi un produs al hidrolizei catabolice a glucozei, efectul glucozei fiind numit în consecință și represie catabolică dar acest produs de hidroliză nu a fost încă stabilit. S-a constatat că prezența glucozei conduce la scăderea considerabilă a nucleotidului AMP-ciclic care rezultă din ATP sub acțiunea enzimei adenilat ciclaza.

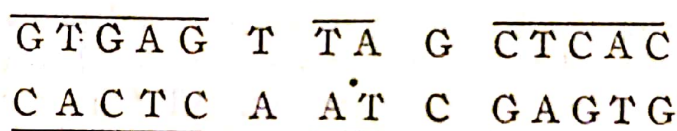
E.coli conține concentrații mari de cAMP atunci când este flămînzită în sursă de carbon și energie și concentrații foarte scăzute de cAMP când crește pe glucoză. Nu se știe cum nivelul de energie catabolică afectează nivelul intracelular de cAMP la *E.coli*. Se admite că un oarecare produs de glicoliză este eliberat într-un stadiu ulterior glucozo-6-fosfatului și inhibă acțiunea adenilat ciclazei, descrescînd rata formării cAMP din ATP. Există și alternativa ca produsul de glicoliză să stimuleze hidroliza cAMP de către fosfodiesterază, rezultînd AMP neciclic. Această constatare a lui Sutherland a sugerat lui Pastan și Perlman că cAMP este mediatorul direct al represiei catabolice. Prezența cAMP este o condiție necesară pentru inducția operonului *lac*. Produsul hidrolizei catabolice a glucozei inhibă formarea enzimelor lactozei prin scăderea concentrației intracelulare de cAMP. Mutanții de *E.coli* lipsiți de adenilat ciclază sînt incapabili de a converti ATP în cAMP, fiind într-o permanentă stare de represie catabolică, la asemenea mutanți nefiind sintetizate enzimele ce intervin în metabolizarea zaharurilor precum lactoza, galactoza, maltoza și arabinoza avînd fenotipul *Lac⁻ Gal⁻ Mal⁻ Ara⁻*. Manifestarea fenotipică a acestor mutanți are la bază nu mutații în genele operonilor respectivi ci absența unui tip special de proteină care mediază rolul jucat de cAMP esențial în inducerea sintezei enzimelor de fermentație a zaharurilor. Tipul normal de *E.coli*, spre deosebire de tipul mutant, conține o proteină cu afinitate pentru cAMP, care se leagă la aceasta, numită proteină activatoare a catabolitului sau CAP. Acești mutanți prezintă leziuni la nivelul genei *crp* a CAP. Rolul cAMP și CAP în inducția enzimatică a fost demonstrat în experiențe de transcriere *in vitro* a ARNm al operonului *lac*.

Reversibilitatea legăturii dintre o genă funcțională și proteina sa reglatoare depinde de proprietățile alosterice ale proteinei. ADN la nivelul promotorului *lac* prezintă două conformații specifice, una inițială cu bucle de împerechere în regiunea de interacțiune cAMP — CAP și alta cu regiunea de interacțiune cu transcriptaza (ARN polimeraza) aflată în stare denaturată, stare care permite legarea transcriptazei. Legarea

transcriptazei determină modificarea confirmăției ADN la situl de interacțiune care face să fie eliberat complexul cAMP — CAP — și ADN să revină la conformația inițială.

S-a realizat și analiza secvenței de nucleotide a ARNm al operonului *lac* transcris *in vitro*. Această analiză a arătat că ARNm poligenic *lac* prezintă la capătul său 5', unde este inițiată sinteza sa, o secvență de nucleotide care este complementară porțiunii de ADN corespunzătoare regiunii operator *lac*, avînd capacitatea de a lega represorul. Rezultă deci că transcrierea operonului *lac* începe cu situl operator unde se află situl de inițiere a transcrierii. Acest sit de inițiere a transcrierii este blocat atunci cînd represorul este atașat la operator.

Situl de inițiere a transcrierii nu este același cu situl de legare la ADN a complexului cAMP — CAP spre a facilita transcrierea operonului *lac*. Secvența sitului de legare a cAMP — CAP a fost stabilită prin analiza secvenței de nucleotide a fragmentului de ADN λ *lac* care a fost protejat față de digestia cu DN-aza prin legarea la el a CAP. Această secvență a sitului de legare a CAP are următoarea structură:



cea ce denotă existența unei simetrii birotazionale de tip palindrom (barele) cu o axă mediană (punctul). Această secvență este deci complet diferită de aceea a sitului *lac* O, dar că și acesta are bisimetrie rotatorie.

Folosindu-se un fag λ *lac* special construit care încorporează operonul *lac* dar transcrierea acestuia începea nu de la nivelul operatorului ci de la nivelul ADN fagic, iar această transcriere să se desfășoare continuu, fără a întîlni semnale de terminare în genomul bacterian *lac* s-a obținut un transcript continuu al întregii regiuni reglatoare a operonului *lac*. Pe baza secvențierii acestuia s-a putut stabili cu precizie că secvența sitului de legare a CAP identificată anterior se află la o distanță de 17 baze la dreapta capătului genei *lac* I. La dreapta sitului de legare a CAP se află segmentul de ADN care este protejat față de digestia cu DN-ază prin complexarea cu ARN polimeraza și astfel s-a tras concluzia că aici se află situl de atașare a acestei enzime de transcriere. Mutațiile promotore de tip „down“, *lac* P—L 8 și *Lac* P—L 29, fiecare avînd la bază o tranziție de baze, apar în cadrul sitului de legare a CAP, pe cînd mutațiile promotore „up“ desemnate P—p^r și *lac* P—UV 5, una reprezentînd

o tranziție de baze, iar cealaltă o dublă mutație, tranziție și transversie, se află în apropierea centrului sitului de atașare a ARN-polimerazei.

Regiunea reglatoare a operonului *lac* se întinde între ultimul codon al genei *lac I* și primul codon al genei *lac Z*, cuprinzând circa 150 perechi de baze. Primele 85 perechi de baze, proximale genei *lac I*, reprezintă situl promotorului (*lacP*) în cadrul căruia se află două regiuni funcționale separate — regiunea de legare a CAP alcătuită din 14 perechi de baze, aflată în proxima vecinătate a genei *lac I* și regiunea de legare a ARN polimerazei, lungă de circa 65 perechi de baze, aflată distal față de gena *lac I*. În continuarea sitului de legare a ARN polimerazei, spre capătul proximal genei *lac Z* al sitului promotor se află situl operator *lac O* care include 24 perechi de baze. La nivelul acestei secvențe se află și situl de inițiere a transcrierii ARN_m al operonului *lac*.

Pentru ca ARN polimeraza să se poată atașa la situl său de legare este necesară combinarea CAP cu cAMP iar complexul format cAMP — CAP să se lege la situl de legare a CAP, complexul cAMP—CAP avînd capacitatea de a determina o desfăcere locală a dublului helix ADN, expunînd catena matriță unică la care se va atașa ARN polimeraza. Cînd represorul a fost legat la situl *lac O*, chiar dacă ARN polimeraza se leagă la catena matriță în transcrierea ARN, ea nu poate atinge situl de inițiere a transcrierii ARN_m și astfel transcrierea operonului *lac* este împiedicată. Iată deci că transcrierea operonului *lac* se află atît sub control pozitiv cît și sub control negativ. În cadrul controlului pozitiv complexul CAP—cAMP face ca ARN polimeraza să se lege la matriță ca un preludiv al transcrierii, pe cînd în exercitarea controlului negativ represorul blochează dacă este în stare activă și atașat la operator inițierea transcrierii ARN_m de către ARN polimerază.

Dacă genele *lac* sînt plasate într-un mediu reactiv *in vitro* care conține ARN-polimeraza și precursori ARN, transcrierea ADN al operonului *lac* nu are loc decît dacă este prezent AMP-ciclic (acidul 3'—5' adenilic ciclic). De asemenea transcriptia *in vitro* a operonului *lac* necesită pe lîngă AMP ciclic și prezența unei proteine catabolice activatoare (CAP) sau CRP cu $GM = 45\,000$ care se leagă de acest AMP (vezi fig. 70).

Rezultă că exprimarea totală a operonului *lac* necesită atît îndepărtarea represorului de pe operatorul *lac* cît și efectul stimulator al complexului CAP-ciclic AMP asupra promotorului, operonul *lac* aflîndu-se atît sub un control negativ (o proteină

repressoare inhibă transcripția prin interacțiunea cu un operator) cît și sub un control pozitiv (stimularea transcripției de către complexul ciclic AMP. CAP care acționează la nivelul promotorului).

Operonii inductibili precum operonul *lac* sînt aceia care în mod obișnuit sînt blocați — fiind deci slab transcriși sau netranscriși. În prezența moleculelor efectoare asemenea operoni sînt induși să funcționeze, realizîndu-se o transcriere intensă.

Un alt operon, operonul *gal* la *E.coli* are o organizare similară operonului *lac*. O organizare deosebită o prezintă însă operonul arabinozei. În cadrul acestui operon, trei dintre genele structurale (*ara B*, *ara A* și *ara D*) sînt dispuse într-un singur grup genic pe cînd cea de-a patra (*ara E*) este dispusă separat într-o altă parte a cromozomului bacterian. În acest caz arabinoza este efector atît pentru genele grupate cît și pentru gena izolată *ara E*. Gena *ara C* este gena reglatoare a operonului arabinozei. Mutațiile nonsens în această genă fac ca arabinoza să nu poată fi metabolizată deoarece nu are loc sinteza enzimelor necesare. Acesta este un efect pleiotropic negativ spre deosebire de efectul mutațiilor în gena reglatoare i^- a operonului *lac* sau în gena reglatoare R^- a operonului *gal* care determină o sinteză de tip constitutiv a genelor structurale. Produsul genei *C* determină deci un control pozitiv asupra operonului *ara*. Aceasta înseamnă că în prezența sa operonul este exprimat pe cînd în absența sa operonul nu este exprimat. În cadrul operonului *ara* regiunile active au următoarea succesiune: operator-inițiator (regiune asemănătoare promotorului) -gene structurale spre deosebire de așezarea acestora în cadrul operonului *lac*: promotor-operator-gene structurale. O astfel de diferență în organizarea operonilor *ara* și *lac* de la *E.coli* poate determina caracteristicile lor specifice de funcționare, primul fiind supus unui control pozitiv, pe cînd al doilea este supus unui control negativ. Asemenea operoni *lac*, *gal*, *ara* sînt operoni inductibili.

5. SISTEME REPRESIBILE LA BACTERII

Multe gene bacteriene implicate în căi metabolice esențiale sînt represibile, ceea ce înseamnă că ele sînt în mod normal funcționale iar sinteza produsului lor încetează în prezența

unei molecule efectoare care reprezintă transcrierea operonului lor. Astfel, la *Salmonella typhimurium* genele din operonul *his*, care specifică enzimele ce intervin în sinteza histidinei sînt funcționale atunci cînd în celulă se află o concentrație mică de histidină. Cînd concentrația histidinei este mare expresia acestor gene este represată și sinteza histidinei încetează. Explicația unui asemenea comportament se poate da admitînd că histidina acționează ca un efector care inițial a fost numit *corepresor*. Acest corepresor (histidina) se cuplează cu o proteină reglatoare care în mod normal este inactivă și o transformă într-un represor activ care blochează transcrierea operonului *his*. Studiul genetic al reglării operonului *his* nu a putut evidenția existența unei singure gene reglatoare, în schimb a arătat că există cel puțin cinci gene simbolizate *his R*, *his U*, *his W*, *his S* și *his T* care, suferind mutații recesive, determină o expresie constitutivă a operonului, fiind implicate în producția ARN_{his}^t sau *histidil-ARN^t sintetazei*. De asemenea s-a arătat că nici histidina și nici ARN_{his}^t liber nu acționează ca efector în blocarea activității operonului *his*. Expresia operonului este însă dependentă de concentrația *histidil-ARN^t* din celulă care, atunci cînd e mare reprezintă operonul *his* iar cînd e mică îl deblochează.

În calea metabolică a sintezei argininei la *E.coli* intervin opt enzime care sînt specificate de opt gene distincte dispuse în patru regiuni diferite ale cromozomului bacterian. Dar toate aceste gene sînt controlate de o singură genă reglatoare *arg R*. Produsul acestei gene este o proteină represoare sensibilă la concentrațiile intracelulare de arginină. Existența unei singure gene reglatoare și a unei separări a genelor argininei face ca, în vederea funcționării, fiecare genă sau grup de gene să posede propria sa regiune operatoare. Regiunile operatoare pot fi similare.

La *E.coli* sinteza triptofan-sintetazei, produs proteinic al genelor *trp A* și *trp B* este represată în prezența triptofanului în mediul de cultură, fenomen cu o înaltă valoare adaptativă ca și inducția enzimatică, economisind resursele celulei.

Prezența triptofanului exercită un control coordonat asupra expresiei a 5 gene contigui *trp A*, *B*, *C*, *D*, *E*, care dirijează sinteza triptofan-sintetazei (*trp A*, *trp B*), PRA izomerazei și IGP-sintetazei (*trp C*) fosforibozilpirofosfat-antranilat transferazei (*trp D*) și antranilat sintetazei (*trp E*), toate implicate în scăderea sau creșterea concentrației de triptofan în celulă.

Aceste gene constituie și ele un operon care este însă coordonat represibil, căci în acest caz represorul este în stare inactivă, care nu-i permite combinarea cu operatorul în absența triptofanului. Represorul devine activ (se combină cu operatorul) numai în prezența triptofanului. *E.coli* prezintă mutanți de tip constitutiv care produc cantități maxime de enzime care intervin în sinteza triptofanului, chiar și atunci când triptofanul se află în concentrație mare. Acești mutanți desemnați *Trp R* sînt fie lipsiți de represor sau sintetizează un represor mutant ce nu poate fi activat de triptofan.

Gena *trp. R*, spre deosebire de gena *lac I* se află localizată la o mare distanță de (la circa 1/4 din lungimea cromozomului bacterian) față de genele *trp*. Represorul *trp* are ca țintă o regiune operatorie aflată la capătul genei *trp^E*.

Inducția enzimatică și represia enzimatică apar ca două fațete ale aceleiași monede, diferența dintre ele constînd în esență în natura represorului. Cele două aspecte contradictorii reprezintă unitatea dialectică a fenomenului de reglare a acțiunii genice.

Secvența lider (ghid) și atenuatorul. Reglarea activității genelor structurale se realizează deci la nivelul transcrierii, dar reglarea este posibilă și la nivelul traducerii.

ARNm pentru operonul *lac* la *E.coli* începe cu o secvență lider de 38 nucleotide la capătul 5'. Secvența este implicată în legarea ARNm poligenic la subunitatea ribozomală 30 S. Asemenea secvență lider a fost evidențiată și la alte tipuri ARNm.

Diferențele în secvența de baze a secvenței lider, mai ales dacă formează și bucle *hairpin* (ARNm *lac* și ARNm *gal* de exemplu) condiționează diferențe în afinitatea de legare la ribozomi, acestea fiind implicate în reglarea ratei de traducere a ARNm. Asemenea diferențe pot de asemenea să condiționeze longevitatea diferitelor molecule de ARNm condiționată de susceptibilitatea acestora la exonucleaza 5' → 3'. La ARNm al operonului triptofan secvența lider are 160 nucleotide și separă începutul secvenței operatorie proximale genei *trp E* de capătul 5' al ARNm *trp*. Studiul mutanților constitutivi *Trp R* crescuți în prezența triptofanului, a arătat că acești mutanți nu conțin un nivel maxim posibil de ARNm *trp*. Aceasta a făcut să fie revizuită concepția că reglarea operonului *trp* este realizată doar pe seama represiei de către produsul genei *trp R* care acționează asupra sitului *trp O*. S-a admis că la tipul

normal de *E. coli* există în cromozom un sit genetic între locusul *trp* O și începutul genei *trp* E la care nivelele reziduale de triptofan pot acționa spre a reduce rata transcrierii ARNm *trp*. Acest sit s-a numit atenuator. Situl atenuator a fost stabilit de către Yanofsky că se află între perechile de baze 130 și 160 începînd de la situl de inițiere a transcrierii ARNm *trp*. Ate-nuatorul este implicat în așa-numitul fenomen de atenuare care constă în terminarea indusă de către triptofan a transcrierii ARNm *trp*. Terminarea precoce apare la al 141 rest de la situl de inițiere a catenei ARNm unde se află un șir de resturi de acid guanilic și citidilic urmat de un șir de resturi de acid uridilic, ceea ce este în acord cu constatarea că semnalele de terminare pentru ARN polimerază sînt codificate în matrița ADN ca blocuri de perechi G-C urmate de blocuri de perechi A-T. În celulele derepresate constitutive Trp R⁻, crescute în prezența triptofanului, la circa 10 inițieri ale transcrierii secvenței lider a ARNm *trp* apare o transcriere total reușită a ARNm *trp* pentru întreg operonul *trp*. În absența triptofanului însă aproape fiecare inițiere a transcrierii secvenței lider este continuată cu transcrierea integrală a operonului. Absența triptofanului înlătură terminarea transcrierii la nivelul sitului atenuator.

În procesul de atenuare au fost implicate și două proteine, una dintre ele fiind *triptofenil-ARNt* sintetaza. ARN_t^{trp} deacil-lat (lipsit de triptofan) mediază înlăturarea terminării produsă de concentrații scăzute de triptofan la nivelul atenuatorului. A doua proteină implicată în procesul de atenuare este factorul *rho*. Acest factor joacă un rol esențial în recunoașterea de către ARN-polimerază a semnalelor de terminare a transcrierii aflate în ADN bacterian și la unii fagi. S-a stabilit că atenuatorul *trp* este un semnal de terminare dependent de factorul *rho*.

6. INHIBIȚIE PRIN FEEDBACK

Genele represibile sînt supuse acțiunii mecanismului reglator numit inhibiție prin *feedback* (*retroinhibiție* sau *efect Novick—Szilard*) prin care produsul final al căii metabolice inhibă activitatea primei enzime a acesteia.

Astfel, în calea metabolică a histidinei, prima enzimă este *pirofosforilaza*. Când histidina este în concentrație intracelulară mare, molecula de histidină se leagă la o regiune specifică a acestei enzime schimbându-i conformația sa tridimensională astfel că enzima devine nefuncțională. Când se ajunge la un nivel scăzut de histidină, aceasta părăsește enzima care, refăcându-și conformația spațială devine din nou activă.

Dacă *E. coli* este crescută pe mediu minimal cu glucoză și la aceasta se adaugă brusc izoleucina încetează imediat funcționarea sau sinteza ARNm pentru sinteza acestui aminoacid. Dacă nu ar fi un mecanism de control suplimentar, enzimele preexistente ar putea să determine producerea în continuare de izoleucină. Dar un asemenea răspuns al celulei ar fi neeconomic și inutil, nonconform cu principiile generale ale funcționării sistemelor biologice. Concentrația mare de izoleucină blochează însă activitatea enzimei ce catalizează prima etapă în calea metabolică de sinteză a izoleucinei, care începe cu treonina.

Blocarea se datorește legării izoleucinei la *treonindezaminaza*. Produsul final se combină reversibil cu un sit al enzimei diferit de centrul său activ specific substratului (treoninei) determinând distorsiuni în configurația sa spațială, transformînd-o alosteric și făcînd-o incapabilă de a mai recunoaște și a se lega la substrat.

Asemenea enzime la care și alte regiuni ale moleculei lor, diferite de centrul activ specific substratului pot interacționa steric se numesc proteine alosterice, iar moleculele mici care determină transformări alosterice se numesc efectori alosterici. Aceștia nu au nici o omologie structurală cu substratul. Legătura dintre proteina alosterică și efectorul alosteric este slabă, de tipul forțelor van der Waals sau punților de hidrogen. Enzimele alosterice funcționează ca receptori de semnale chimice.

Represia enzimatică și inhibiția prin *feedback* (retroinhibiția enzimatică) au același rezultat al acțiunii și anume blocarea funcționării operonului. Dar există diferențe de esență între aceste două mecanisme. În represiia enzimatică proteina reglatoare (represorul) acționează nemijlocit asupra genei pe cînd în inhibiția *feedback* produsul final al unei căi metabolice blochează desfășurarea acesteia prin interacțiunea cu prima enzimă a căii metabolice considerate.

7. REGLAREA SINTEZEI PROTEINICE PRIN MODULARE

Cantitatea de proteine sintetizate este controlată și prin modulare care înseamnă folosirea cu frecvență diferită a varia-
telor tipuri de ARN^t aflați în mediul celular în diferite canti-
tăți. Când cantitatea diferitelor tipuri de ARN^t este mică se
reduce rata traducerii ARN^m în proteină.

Pe această bază s-a încercat să se explice de ce la indivizii
umani heterozigoți pentru talasemie, hemoglobina normală se
sintetizează în cantitate mult mai mare decât hemoglobina
anormală cu toate că teoretic ele ar trebui să fie sintetizate în
cantitate egală.

Sînt unele ipoteze după care reglarea genetică s-ar realiza
la nivelul traducerii mesajului genetic prin legarea represorului
la situl activ al enzimei în curs de sinteză făcînd ca sinteza
acesteia să nu fie săvîrșită sau dacă este terminată enzima să
nu fie funcțională.*

8. REPLICAREA ADN ȘI TRANSCRIEREA

Replicarea ADN ca și conformația sa macromoleculară in-
fluențează transcrierea. Astfel, genele dintr-un operon care
sînt replicate primele sînt și genele care sînt la început tran-
scrise în enzime ce intervin în primele etape ale căii meta-
bolice.

Cel mai interesant caz de control al sintezei proteinice în
funcție de replicarea cromozomală este oferit de controlul coor-
donat al sintezei proteinelor ribozomale.

Sinteza celor peste 50 de proteine ribozomale diferite (pro-
teine *r* de tip *S* și *L*) este foarte coordonată la *E. coli* deși
genele pentru proteinele *r* sînt aranjate în mai mulți operoni
diferiți, plasați în diferite regiuni ale cromozomului bacterian
(Olsson și Gausling, 1980).

S-a ridicat problema, cum reușesc bacteriile să-și ajusteze
conținutul de ribozomi la un nivel corespunzător ratei de sin-

* Asemenea mecanisme ar putea sta și la baza raportului domi-
nanță-recesivitate, astfel că la heterozigoți funcționează doar alela do-
minantă. Este de asemenea posibil ca în aceste cazuri să fie funcțională
și alela recesivă doar produsul său de transcriere să fie hidrolizat de
enzime specifice sau să nu fie activ în traducerea mesajului, genetic
(reglare la nivelul traducerii).

teză generală a proteinelor? Primul indiciu că în acest caz sint implicate mecanisme speciale de reglare vine de la observația că tulpinile merodiploide care conțin factori F' cu unele dintre genele ribozomale, de asemenea sintetizează proteine r în cantități echilibrate. Reglarea generală a sintezei proteinelor r trebuie apreciată în funcție de particularitățile de replicare ale cromozomului bacterian (Antohi și Gavrilă, 1981) Se știe că fiecare rundă de replicare a cromozomului *E. coli* începe la un punct de origine a replicării localizat după minutul 83 pe harta genetică. Replicare se desfășoară bidirecțional de-a lungul circumferinței cromozomului bacterian circular spre un terminus de replicare situat în jurul minutului 27. Consecința acestei particularități de replicare a cromozomului *E. coli* este că genele situate lângă originea replicării, fiind replicate mai timpuriu în ciclul de replicare se află în doză dublă față de cele aflate lângă terminusul replicării. Această diferență în doza de gene situate lângă originea replicării și cele situate la mijlocul cromozomului sau în jurul punctului terminus al replicării este și mai mare dacă în timpul creșterii rapide pe mediu nutritiv favorabil, următorul ciclu de replicare este inițiat înainte ca cel precedent să se fi terminat, apărând astfel mai mult de o bifurcație de replicare per cromozom în ambele direcții. Astfel, o genă A aflată lângă punctul de origine a replicării se va afla în doză dublă față de o genă Z, aflată lângă terminusul replicării, la un moment dat în desfășurarea procesului de replicare.

Dar rata de inițiere a transcrierii ARNm este direct proporțională cu numărul de copii genice, ca și rata sintezei produșilor acestor gene. Astfel că genele aflate lângă originea replicării sînt transcrise și traduse cu o rată mai mare. Experiențele de cartare au arătat că întregul ansamblu de gene care codifică cele 32 de proteine ale subunității ribozomale 50 S, gene desemnate *rpl* (proteine ribozomale L) și de gene *rps* care codifică cele 21 proteine ribozomale din subunitatea 30 S se află localizat pe harta cromozomului *E. coli* între minutele 72 și 88 în regiunea *str-spc* adică exact în zona originii replicării (minutul 83). Mai mult, ARNr este codificat în trei secvențe aproape identice desemnate ca loci *rrn* intercalate între genele *rpl* și *rps* (Stent și Calender, 1978), respectîndu-se astfel principiul că genele cu funcțiuni înrudite au localizări adiacente în cromozomul bacterian.

Această topologie caracteristică a genelor pentru proteinele ribozomale localizate proximal față de regiunea originii repli-

cării face ca în timpul creșterii rapide a *E. coli*, cantitatea de proteine ribozomale să crească de 10 ori mai mult față de aceea înregistrată în timpul creșterii încetinite pe mediu sintetic cu prolină.

Reglarea generală a sintezei proteinelor ribozomale ca răspuns la schimbările în condițiile de mediu este însă mediată în primul rând de schimbări în rata de transcriere a genelor proteinelor ribozomale. Expresia genelor proteinelor ribozomale este reglată și prin control post-transcripțional. Circa jumătate din genele pentru proteinele ribozomale, cartate în regiunea *str-spc* sînt aranjate în patru unități de transcriere separate (transcriptoni). Rata de transcriere a genelor proteinelor ribozomale în regiunea *str-spc* crește în paralel cu doza de gene cînd extracopii ale acestor gene sînt oferite de un factor F' sau un fag λ transductant.

Deoarece rata de sinteză a proteinelor ribozomale este neafectată de asemenea schimbări în doza de gene, s-a tras concluzia că traducerea genelor proteinelor ribozomale cade sub un control post-transcripțional. Controlul post transcripțional acționează prin inactivarea și degradarea excesului de ARNm pentru proteine ribozomale.

Coordonarea precisă a sintezei proteinelor ribozomale în celulele normale, cuplată de observarea recentă că grupe de gene pentru proteine ribozomale sînt distribuite pe o mare lungime din cromozomul bacterian, sugerează că reglarea post-transcripțională ar fi putut evolua în celulele normale spre a compensa replicarea succesivă a diferitelor gene ale proteinelor *r* în timpul ciclului celular (Olsson și Gausing, 1980).

9. RĂSPUNSUL STRINGENT

La bacterii s-a evidențiat un mecanism de reglare a activităților sintetice din celulă în condiții extreme, mai ales în condiții de înfometare. Astfel, dacă bacterii prototrofe sînt mai întii crescute pe un mediu bogat în aminoacizi în care caz este inhibată transcrierea tuturor genelor represibile implicate în biosinteza aminoacizilor și apoi sînt trecute pe un mediu fără aminoacizi celulele trebuie să-și sintetizeze enzime biosintetizatoare esențiale în absența unui aport de aminoacizi exogeni.

Răspunsul celulei bacteriene la asemenea situații stringente este exprimat prin reducerea vitezei de sinteză a ARNr și ARNt în special, a nucleotidelor, a fosforilării ca și a altor pro-

cese de sinteză și degradare din celulă, în speță *turn-overul* proteinelor. În acest fel celula are șansa de a supraviețui. Numai tulpina K_{12} de *E. coli* continuă sinteza ARN, chiar în absența aminoacizilor. Acest comportament excepțional al tulpinilor K_{12} derivate din tulpina *A* are la bază o mutație într-o genă care a fost desemnată *rel A* (de la control relaxat al sintezei ARN) care scoate celula de sub controlul normal „stringent” exercitat de absența aminoacizilor în mediu. Răspunsul stringent este deci controlat genetic. Gena *rel A* condiționează răspunsul stringent al celulei pe când alela sa recesivă *rel A*⁻ nu conferă celulei proprietatea de a da un răspuns stringent. A fost izolat produsul genei *rel A*⁺ care s-a dovedit a fi o proteină ce a fost numită *factorul stringent*. În timpul flămânzirii în aminoacizi, factorul stringent catalizează formarea unei nucleozide neobișnuite 3'-difosfat-5'-difosfat (*pp Gpp*) din guanozindifosfat sau din *ppG* și ATP sau *pppA*. La celulele *rel A*⁺ se acumulează nucleotidul guanozintetrasfosfat-*ppGpp* care acționează ca efector precum face ciclic AMP, sau se combină cu ARN-polimeraza blocând transcrierea. Mutantele cu control relaxat (*rel A*⁻) sînt lipsite de factorul stringent activ codificat de gena *rel A*⁺ și ca urmare nu acumulează *ppGpp* în timpul flămânzirii în aminoacizi. Factorul stringent este activ numai prin asociere cu un ribozom intact 70 S angajat în traducerea ARN_m și purtînd în situl său aminoacil — un ARN_t deacilat (fără aminoacidul corespunzător) ce răspunde la codonul următor ce trebuie tradus. În condiții de flămînzire, cele mai multe molecule de ARN_t sînt deacilate. Nu este încă clarificată legătura dintre *ppGpp* și sinteza ARN_r și ARN_t. Este posibil ca acumularea de *ppGpp* să blocheze inițierea la situl promotor la nivelul căruia începe transcrierea ARN_r sau a ARN_t, dar pot fi implicate și alte mecanisme, acumularea *ppGpp* putînd fi mai curînd o consecință decît o cauză a absenței sintezei celor două tipuri de ARN celular.

Tulpinile auxotrofe bacteriene sînt obligate de a da un răspuns stringent spre a supraviețui, pentru o anumită perioadă de timp. Răspunsul stringent are astfel o evidentă valoare adaptativă.

Celulele eucariote, cu excepția drojdiilor, nu au capacitatea de a da un răspuns stringent în situații de carență de aminoacizi, ele fiind astfel „relaxate”, sintetizînd la nivele normale ARN.

10. REGLAREA ACTIVITĂȚII GENICE LA EUCARIOTE

Mecanismele implicate în reglarea expresiei genice la eucariote sînt mult mai complexe și mai variate.

10.1. ASPECTE GENERALE ALE REGLĂRII GENICE LA EUCARIOTE

La eucariote reglajul genetic, nu se realizează la nivelul operonilor ci la nivelul genelor. ARNm purtînd mesajul genetic pentru o singură proteină sau catenă polipeptidică, fiind deci monocistronic. Acest fapt a fost demonstrat prin compararea mărimii poliribozomilor angajați în sinteza miozinei, actinei, sau catenelor ce intră în alcătuirea hemoglobinei sau gammaglobulinei.

În celulele eucariote nu a fost evidențiată o funcționare a genelor încadrate în operoni similari procariotelor.

În funcționarea ADN eucariotic ca matriță pentru sinteza ARN un rol important îl are însăși conformația spațială, tridimensională a nucleohistonelor, supraspiralizarea acestora împiedicînd funcționarea ADN ca matriță. Ca regulă, cromatina condensată nu poate fi transcrisă, pe cînd cromatina difuză poate permite ca ADN să funcționeze ca matriță pentru sinteza ARN. ARN se sintetizează în interfază, cromozomii metafazici fiind matrițe sărace pentru transcrierea *in vitro*. Cele mai multe pufuri din cromozomii politeni sînt situri de transcriere, fiind eucromatice, deși provin din benzi heterocromatice. În nucleii interfazici în care se află cromozomii politeni organizatorul nucleolar este un puf gigant la nivelul ADN implicat în transcrierea ARNr.

Deoarece aceeași regiune cromozomală este eucromatică într-un moment dat și heterocromatică într-un alt moment al interfazei, acest tip de heterocromatină implicată în reglajul genetic are caracter facultativ spre a fi diferențiată de heterocromatina constitutivă. Tot astfel, buclele cromozomilor lampbrush de la amfibieni reprezintă situri de sinteză a ARN. Buclele pornesc simetric de o parte și de alta a bivalentului lampbrush, de la nivelul unei cromomere aflată în axa principală a bivalentului. Fiecare buclă însă este asimetrică, adică subțire la un capăt care pornește din axa principală și devine

din cei în ce mai groasă spre celălalt capăt de ataşare la axă. Sinteza ARN demonstrată autoradiografic prin marcarea cu uridină-³H are loc în bucle, nu în axa principală şi începe la capătul subţire al buclei continuând în jurul acesteia spre capătul gros. Acest gradient de grosime prezentat de buclă este reprezentat de moleculele ribonucleoproteice depozitate. De fapt gradientul de grosime este rezultatul alungirii moleculelor de ARN în stadii succesive de sinteză de-a lungul buclei. Buclele *lampbrush* apar deci ca porţiuni ale unui cromozom temporal despiralizate spre a fi transcrise.

La eucariote o parte importantă din genom intervine în reglajul genetic iar o altă parte are caracter redundant. La eucariote în urma complexării cvasipermanente a histonelor (care sînt represori generali, nespecfici, la eucariote) cu macromolecula ADN, majoritatea genelor se află în stare inactivă sub acţiunea represoare a histonelor. Trecerea lor din stare inactivă în stare activă are caracter reversibil. Histonele bogate în lizină pot bloca transcrierea prin aceea că determină plierea duplexului ADN. Histonele bogate în arginină şi moderat bogate în lizină pot controla transcrierea prin legarea la adîncitura mare a duplexului ADN, blocînd denaturarea prin deacetilare şi defosforilare şi împiedicînd astfel iniţierea transcrierii. Prin acetilare şi fosforilare sau prin degradare sub acţiunea *histon-proteazei*, histonele sînt îndepărtate de pe ADN; aceasta poate funcţiona ca matriţă în sinteza ARN şi astfel gena funcţionează. Şi transcriptaza poate fi inactivată prin legarea la ea a unor histone bogate în arginină.

10.2. REGLAJ PE TERMEN SCURT ŞI REGLAJ PE TERMEN LUNG

La eucariote se distinge o reglare pe termen scurt (*short-term*) sau imediată numită încă reglare reversibilă, reprezentată de modificări în activitatea sau concentraţia intracelulară de enzime, de hormoni, ca şi de fluctuaţii în intensitatea sintezei ADN, ARN şi proteinelor etc. şi o reglare pe termen lung (*long term*) sau ireversibilă, care implică fenomene legate de determinare sau diferenţiere desfăşurate în cadrul dezvoltării ontogenetice de-a lungul unor nenumărate trepte care duc la evoluţia dintr-un ou fecundat la un organism cu circa 3 trilioane de celule.

REGLAREA GENETICĂ PE TERMEN SCURT

10.3. REGLAREA LA NIVELUL TRANSCRIERII GENETICE LA EUCARIOTE

Atât la organismele eucariote unicelulare cât și la cele pluricelulare materialul genetic este transcris diferențiat în ARN, în diferite stadii ale diferențierii și dezvoltării. Această concluzie are la bază numeroase observații experimentale. Astfel, analiza modelului de pufare la cei patru cromozomi politeni din glandele salivare de *chironomus* arată că trei dintre ei au protuberanțe mari (pufe). Pufeale a doi cromozomi lungi sînt nucleoli în care are loc transcrierea activă a ARNr pe matrița de ADN organizator nucleolar. Puful celui de-al patrulea cromozom este implicat într-o masivă transcriere de ARNm. La nivelul pufurilor cromatina se află în stare difuză, permițînd ADN-ului său să funcționeze ca matriță în transcrierea ARN. Puful reprezintă o manifestare direct vizibilă a transcrierii active a unui set particular de gene situate în sectorul pufat al cromozomului.

La mamifere s-a constatat că enzima lactat-dehidrogenază (LDH) funcționează diferit în condiții aerobe și anaerobe. În diferitele celule ea este sintetizată sub forma a cinci forme moleculare numite izozime care au proprietăți electroforetice distincte. Enzima este formată din două catene polipeptidice A și B și sinteza acestora este dirijată de două gene diferite: A și B. Izozimele sînt tetrameri formați din catene diferite de tip 4 catene A, 3A și 1B, 2A și 2B, 1A și 3B și 4 catene B. LDH cu 4 catene A nu este funcțională în condiții anaerobe, pe cînd LDH cu 4 catene B este funcțională în asemenea condiții. celelalte izozime funcționează cu intensitate intermediară. Rezultă că în funcție de natura mediului, aerob sau anaerob sînt activate fie gena A, fie gena B. Această transcriere diferențiată (funcționarea genelor într-o anumită ordine) a fost evidențiată chiar și la procariote. Astfel, la *Bacillus subtilis*, ARNm extras din diferite etape ale ciclului celular este diferit, în funcție de care gene sînt transcrise într-o etapă dată.

Un exemplu de reglare pe termen scurt este inducția enzimelor la ciuperci (*Saccharomyces*, *Neurospora*, *Aspergillus* etc.) și alge eucariote ca răspuns la prezența substratului și represia sintezei lor ca urmare a absenței substratului enzimatic corespunzător. Din acest punct de vedere ciupercile prezintă asemănări cu bacteriile în inducția și represia sintezei enzimelor

care intervin în metabolizarea galactozei, biosinteza leucinei și pirimidinelor etc.

Caracteristic pentru ciuperci este faptul că un grup de enzime reglate răspunde la mai mult de o „moleculă efectoare”. Astfel, sinteza *de novo* a nitrat-reductazei de la *Aspergillus* specificată de gena *nir* este indusă de substratul său — nitratul și represată de produsul final — amoniu. De asemenea genele care suferă mutații prezintă efecte pleiotrope asupra activității unor enzime înrudite. Astfel o mutație în gena *nir* reprezintă activitatea enzimelor nitrat- și nitrit-reductază. Unele mutații ale genei *nir* pot determina ca ambele enzime să fie permanent active, situație care ar putea fi comparată cu mutațiile *i^s* și *i⁻* de la operonul lac de *E. coli*.

Absența unor mutații operator constitutive *cis* dominante la ciuperci le deosebește fundamental pe acestea de bacterii și face inaplicabil la ciuperci modelul Jacob-Monod de reglare a activității genice la bacterii.

Între eucariotele inferioare (ciuperci, alge, protozoare) și cele superioare apar diferențe fundamentale privind reglarea activității genice. Eucariotele superioare se remarcă printr-o variată specializare celulară care determină îndeplinirea unei funcții specifice și imposibilitatea îndeplinirii altor funcții. Mediul intern (sînge și hemolimfa) cu o compoziție stabilă, homeostazică și homeorapică previne fluctuațiile mari de mediu extern, fiecare celulă primind cantități anumite de ioni, zaharuri, aminoacizi și alte molecule esențiale. Astfel, eliberate de efortul de a contracara variațiile mari și bruște de mediu extern, celule eucariotelor superioare pot să-și desfășoare diferitele lor funcții specializate.

Se știe că în genomul eucariotic există un grad înalt de redundanță genetică. Dar numai un procent mic din această redundanță are la bază redundanța genelor pentru ARN ribozomal și ARN de transfer. Restul de ADN redundant se crede că este implicat în reglarea transcrierii și a traducerii diferențiate. Astfel, dacă o transcriptază trebuie să treacă peste secvențe redundante necodificatoare de proteine din ADN înainte de a ajunge la genele codificatoare de proteină, o asemenea secvență redundantă poate funcționa ca programator în timp al transcrierii și anume, cu cît secvența redundantă este mai lungă cu atît transcrierea genei codificatoare de proteină va fi mai întîrziată. Tot astfel, secvența lider a ARNm poate să reprezinte transcrierea unei secvențe redundante din ADN,

această secvență lider fiind implicată în recunoașterea ARNm-ribozom, sau ARNm-RN-ază.

Reglarea pe termen scurt la eucariotele superioare este în cea mai mare parte mediată de hormoni. Un anumit hormon poate avea una sau mai multe tipuri de *celulă țintă*, fiecare tip de celulă răspunzând foarte diferit la același hormon. Unii hormoni reglează acțiunea genică prin afectarea transcrierii, traducerii sau adenilatciclazei. Semnalele hormonale dictează dacă celulele vor produce o proteină dată. Mulți hormoni exercită efectele lor inițiale pe celula țintă la periferia celulei, stimulând activitatea *adenilatciclazei* care este localizată pe membrana celulară și care convertește ATP în ciclic AMP capabil de a stimula transcrierea ca și la bacterii. Ciclic AMP activează enzimele preexistente în celulă, cum ar fi de exemplu fosforilaza.

Unii hormoni afectează expresia genică la nivel cromozomal. Astfel, *ecdizonul* este un hormon steroid care intervine în desfășurarea împupării servind ca moleculă reglatoare care interacționează ca anumite elemente de control din ADN sau servește ca moleculă efectoare care modifică activitatea unei anumite proteine reglatoare dar nu poate fi exclusă nici acțiunea indirectă a sa de facilitare a absorbției unor anumiți ioni care stimulează transcrierea genelor implicate în împupare. La *Chironomus tentans* succesiunea exactă de pufare este I—19 A, I—18 C, IV—2 B în care, I, IV reprezintă cromozomii uriași iar 19 A, 18 C și 2 B benzile la nivelul cărora se manifestă fenomenul de pufare (fig. 72) care oferă matricea ADN pentru sinteza ARN (transcriere). Declanșarea împupării se realizează prin eliberarea spontană a ecdizonului în hemolimfă. Dacă înainte de a începe împuparea larvele sînt injectate experimental cu ecdizon se obține aceeași succesiune de pufare.

Recent s-a stabilit că hormonii steroizi acționează cel puțin în parte la nivelul transcrierii genetice dat fiind faptul că, în prezența actinomicinei D (inhibă specific transcrierea ADN) ei nu mai au nici un efect asupra celulelor țintă.

Dimpotrivă, hormonii care acționează pe calea c AMP sînt insensibili la actinomicina D.

S-a stabilit experimental că hormonii steroizi precum hormonii androgeni, oestrogeni, aldosteronul provoacă valuri de sinteză de ARN în nucleul celulelor lor țintă specifice valuri ce au fost comparate cu fenomenul de pufare din sistemul politen al dipterelor.

Prin marcarea radioactivă a hormonilor steroizi s-a dovedit pătrunderea lor în citoplasma celulelor țintă unde se pare că se

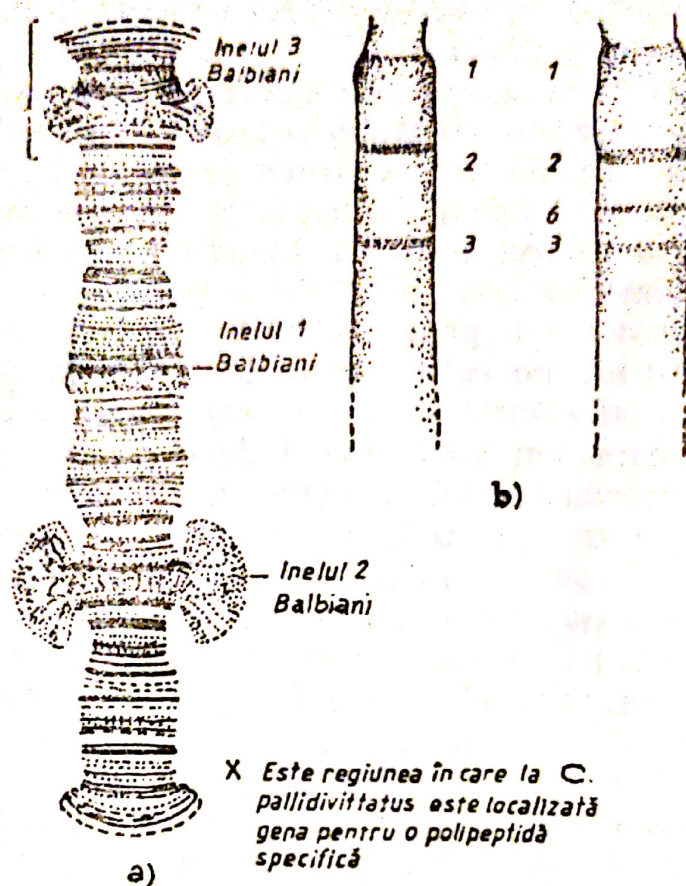


Fig. 72. Dovada citologică a activității diferențiate a genelor. (a). Diagrama cromozomului IV de *Chironomus pallidivittatus*; regiunile active transcripțional ale cromozomului se numesc inele Balbiani. (b). Model de electroforeză acrilamidică al subunităților extrase din secrețiile glandelor salivare.

combină cu o moleculă proteinică receptoare specifică care facilitează pătrunderea lor în nucleu. Cuplat cu proteina reglatoare specifică, hormonul se leagă la ADN, acționând ca un efector al transcrierii. Astfel, din celulele uterului s-a izolat o proteină receptoare a hormonului oestradiol. Hormonul astfel recepționat poate fi transferat în nucleu unde derepresează gene specifice ce vor putea fi transcrise.

Unii hormoni pot stimula transcrierea prin afectarea histonelor. Hormonii de înflorire și oestrogenii descresc conținutul de histonă al cromatinei. Glucagonul și insulina cresc fosforilarea histonelor în ficatul de șobolan. Alți hormoni — antagonici descresc sinteza de ARN. Unii hormoni pot afecta traducerea așa cum fac acidul giberelic și acidul abscisic în germi-

narea timpurie la grâu. Alt hormon vegetal, citokinina influențează încărcarea cu aminoacid a unui ARNt specific.

Hormonii polipeptidici nu pătrund în celula țintă, ci exercită efectul lor la nivelul membranei celulare prin stimularea activității moleculelor de adenilat ciclază care reprezintă o parte a membranei celulare ce catalizează conversia ATP în cAMP, acesta din urmă stimulând transcrierea atât la procariote cât și la eucariote.

La plante *auxinele* ar acționa asupra unui ARNt specific care ar constitui un complex ce ar condiționa inițierea transcrierii și traducerii.

Transcrierea la eucariote nu este deplin înțeleasă în termeni moleculari atâta timp cât nu este deplin înțeleasă organizarea fizică și informațională a cromozomului eucariot.

S-au imaginat diferite mecanisme posibile în care rolul unor molecule reglatoare este îndeplinit de diverse componente proteice ale cromatinei. Astfel, histonele pot determina proprietățile transcripționale ale acizilor nucleici.

Prin fosforilarea, acetilarea, metilarea resturilor aminoacilice ale histonelor etc. se modifică interacțiunea ADN-histonă ceea ce duce la modificarea proprietăților transcripționale ale cromatinei. Histonele joacă rol de reglatori genici generalizați, căci asociate cu ADN determină represiia genelor, complexul ADN-histonă fiind inert transcripțional. Eliminarea histonelor din cromatina izolată din embrionii de mazăre care face ca 20% din ADN să rămână necomplexate cu histone; duce la o creștere notabilă a ratei de sinteză a ARN de circa 500%.

Proteinele nehistonice îndeplinesc rolul unor molecule reglatoare specifice, asigurând transcrierea ADN prin interacțiunea cu histonele, pe care le îndepărtează de pe matrița ADN la nivelul genelor sau promotorilor.

Organismele eucariote prezintă și alte mecanisme de reglare a transcrierii legate de organizarea cromatinei. Astfel, prin *heterocromatinizare* are loc blocarea transcrierii, ADN putând funcționa ca matriță pentru sinteza ARN numai la nivelul cromatinei difuze.

Heterocromatina condensată este prezentă în celulele înalt diferențiate, care sintetizează foarte puține proteine comparativ cu celulele nediferențiate. În leucocita normală apar mase mari de heterocromatină sub forma unor blocuri puternic condensate, pe cînd în celula nediferențiată leucemică heterocromatina este aproape complet absentă, aceasta fiind angajată într-o sinteză proteinică haotică, necontrolată.

Interesante mecanisme de heterocromatinizare prin care se diferențiază așa-numita *heterocromatină facultativă* s-au evidențiat la insectele coccide. Astfel la *Planococcus citri* ambele seturi de cromozomi de origine maternă și de origine paternă sînt active transcripțional în toate stadiile de dezvoltare la femelă dar, în dezvoltarea timpurie a embrionului mascul setul de cromozomi de origine paternă este selectiv inactivat în celulele adulte fiind activ transcripțional doar setul de cromozomi de origine maternă și numai acesta va fi inclus în spermatozoizi.

La cangur și alte marsupiale, cromozomul X derivat de la mascul este selectiv inactivat în celulele femelei.

La mamiferele placentare un mecanism de reglaj specific este reprezentat de fenomenul de *lionizare*, denumire derivată de la numele cercetătoarei americane Mary Lyon care s-a ocupat de studiul acestui fenomen.

Lionizarea presupune un proces de heterocromatinizare a unuia dintre cromozomii X de la femela mamiferelor. Este un fenomen de heterocromatinizare facultativă, cromozomul inactivat apare heterocromatic (în interfază apare sub forma unui corpuscul ovoid, lipit de membrana internă a nucleului și care s-a numit *corpusculul Barr* sau cromatina sexuală) și este inactiv în transcriere, fapt dovedit autoradiografic.

La începutul dezvoltării embrionului femel ambii cromozomi sînt eucromatici și deci activi în sinteza ARN. La om, ca și la alte mamifere inactivarea unuia sau a unei părți a cromozomului X apare, în celule somatice, la puțin timp după fecundare. Este interesant faptul că acei cromozomi X care prezintă deleții sînt preferențial heterocromatizanți.

Chiar și genele care sînt permanent blocate trebuie să fie replicate în fiecare ciclu mitotic. Cromozomii care dau corpusculul Barr au replicare tardivă, condiția condensată interfazică interferînd atît cu replicarea cît și cu transcrierea ADN. În stadiul de blastulă (a 16-a zi de viață intrauterină) unul dintre cromozomii X se heterocromatinizează și devine nefuncțional. Ambii cromozomi X sînt funcționali în linia germinală femelă, cînd cei doi cromozomi X se asociază în meioză și realizează schimb reciproc de gene. Acesta este o dovadă a faptului că heterocromatinizarea este facultativă și poate fi reversibilă. În urma unei translocății reciproce X-autozom, heterocromatinizarea se extinde parțial și asupra genelor autosomale translocate adiacente regiunii de sudură, o genă autosomală putîndu-se comporta ca o genă sexlincată. Indivizii la care a avut loc o

asemenea translocatie reciproca prezinta fenomenul de *variegare*.

Inactivarea cromozomului X este randomizata, in unele celule fiind inactivat cromozomul X de origine maternă, in altele cromozomul X de origine paternă, dar odata decizia luata va fi mostenita de toti descendenții celulei.

Fenomenul lionizării este evidențiat cel mai bine la pisicile *calico* (pisici cu blană neagră și pete portocalii) heterozigote pentru alelele neagră și portocalie ale genei X lincate ce determină culoarea blănii. Pisicile calico au blana cu sectoare neregulate negre și galbene peste tot corpul. Fiecare asemenea sector corespunde unei clone de celule derivate dintr-o celulă în care s-a produs heterocromatinizarea inițială a unuia dintre cromozomii X. Pisicile calico sînt de regulă femele. S-au observat și motani calico, care apar rar fiind sterili căci ei prezintă sindromul Klinefelter, avînd în garnitura de cromozomi un X suplimentar. În urma heterocromatinizării unuia dintre cromozomii X apare fenotipul calico, prin heterocromatinizare fiind inactivate genele sex-lincate. În cazul acestor pisici calico culoarea neagră este determinată de o genă dominantă, pe cînd aceea portocalie de alela sa recesivă. În mod normal constituția cromozomală XX nu ar permite manifestarea alelei recesive în prezenta celei dominante. În celulele în care a fost inactivat cromozomul X ce poartă alela dominantă, alela recesivă se poate exprima și atunci apare pe o porțiune corespunzătoare acestor celule blana de culoare portocalie.

Inactivarea prin heterocromatinizare a fost dovedită și în culturi de fibroblaste umane derivate de la femei heterozigote pentru genele sexlincate. Există o alelă mutantă a genei pentru *glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza*. Dacă celulele se prelevează de la o femeie heterozigotă pentru această genă și se clonează, fiecare clonă va produce fie forma mutantă, fie forma normală a enzimei dar niciodată un amestec de enzimă normală și de enzimă mutantă. Acest comportament al clonelor poate fi explicat prin inactivarea unuia dintre cromozomii X care fiind randomizată determină funcționarea în unele clone a alelei normale, pe cînd în altele a alelei mutante (cele în care este inactivat X ce poartă alela normală).

Lionizarea reprezintă un mecanism elaborat în cursul evoluției mamiferelor, în care paralel cu inactivarea cromozomului Y de la sexul mascul a avut loc inactivarea și a unuia din cei doi cromozomi de sex X de la femelă.

În evoluția mamiferelor cromozomul Y de la mascul a suferit o continuă degradare genetică iar când procesul s-a stabilit pe acest cromozom nu au mai rămas funcționale decât gena sau genele care condiționează evoluția embrionului spre sexul mascul, controlînd transformarea progonadei în testicul. Cromozomul Y este heterocromatic și poate fi pus în evidență chiar în interfază dar numai prin colorare cu fluorocromi. Cum formula cromozomală a sexului mascul la mamifere este XY, înseamnă că, în principiu, doar un singur cromozom poartă genele sexlincate și acest cromozom este X. El este deci funcțional. Femela mamiferelor are formula cromozomală XX. Dacă ambii cromozomi X ar fi funcționali ar însemna că doza de gene la femelă să fie dublă față de mascul, o situație incompatibilă cu dezvoltarea normală a celor două sexe. Prin *lionizare*, adică prin inactivarea unuia dintre cromozomii X de la femelă în urma unui proces de heterocromatinizare se realizează o compensație a dozei de gene, un echilibru funcțional al genelor X-lincate la cele două sexe. Această ipoteză este puternic susținută prin studiul fetușilor mutanți și indivizilor umani cu diferite sindroame care poartă mai mult de doi cromozomi X sau la care lipsește un cromozom X. Astfel, indivizii umani care au trei cromozomi X prezintă în loc de o singură cromatină sexuală, două cromatine sexuale în fiecare celulă, cei cu patru X au 3 cromatine sexuale etc. Mai mult, indivizii masculi care au formula cromozomală XXY ce stă la baza sindromului Klinefelter atît la bărbat cît și la motan prezintă în celule cîte o cromatină sexuală, pe cînd cei normali cu formula cromozomală XY nu prezintă cromatina sexuală. Tot astfel, indivizii femeli cărora le lipsește un cromozom X avînd formula cromozomală XO (*sindrom Turner*) sînt anormali și nu prezintă cromatină sexuală. Rezultă că celulele mamiferelor sînt programate, astfel că numai un singur cromozom X să rămîna eucromatic și să fie funcțional în fiecare celulă, pe cînd ceilalți să fie inactivați prin heterocromatinizare.

Aceasta este ipoteza teleologică legată de fenomenul lionizării, dar nu se știe nimic despre mecanismul real al inițierii, efectuării și menținerii sale.

Și la *Drosophila*, care are aceeași formulă cromozomală a sexelor a fost evidențiat un asemenea mecanism de heterocromatinizare facultativă care face ca pe cromozomii X de la ambele sexe să apară regiuni heterocromatice și eucromatice. Contrar situației de la mamifere, alelele din ambii cromozomi X de la femela drosofilă sînt aparent în egală măsură funcționale.

Mecanismul compensației de doză la drosofilă apare mai curînd la nivelul transcrierii și nu pare a implica heterocromatinizarea. Cromozomul X de la mascul este tot atît de activ în sinteza ARN precum sînt ambii cromozomi X de la femelă, din care cauză celulele masculine prezintă aceeași intensitate a activității enzimelor sex-lincate pe care o au celulele femele, ceea ce sugerează un mecanism de compensație de doză, dar neștiindu-se dacă el se bazează pe represia unuia dintre cromozomii X de la femelă sau pe stimularea funcției unicului cromozom X de la mascul.

Condensarea interfazică a unuia dintre cei doi cromozomi X de la femela mamiferelor care apare ca un corpuscul Barr face ca alelele purtate de acest cromozom X să nu fie transcrise. Acest fapt este susținut de constatarea că încorporarea uridinei tritiate în ARN la nivelul corpusculului Barr din fibroblastele de femelă este de numai 18% din cantitatea încorporată de un volum similar a unei regiuni a cromozomului X care nu este inactivat. Compensația de doză se pare deci că afectează o mare parte a cromozomului X dar nu întregul cromozom. Acesta este un exemplu de reglare a acțiunii genice la nivel multigenic.

10.4. REGLAREA GENETICĂ PE TERMEN LUNG

În dezvoltarea eucariotelor superioare se pornește de la ou sau zigot, care este deja o celulă foarte specializată deoarece îndeplinește și ea funcții specifice pe care nu le poate îndeplini celula matură.

Prin diviziuni mitotice succesive rezultă din celula ou numeroase celule. Unele dintre ele devin atît de determinate încît clonele lor vor da tipuri foarte diferite de celule: hepatice, renale, neuronale etc. Determinarea este apoi urmată de complicate procese de diferențiere care implică mitoză, fuziune celulară, migrație celulară, interacțiuni celulare etc., toate desfășurate după un program bine determinat în care are loc o succesiune exactă de evenimente care se presupun unele pe altele, realizîndu-se în fapt programul genetic.

Citodiferențierea reprezintă procesul prin care apar diferențe stabile între celulele unui individ, diferențiere care în condiții normale nu mai permite reîntoarcerea la forma inițială, din stadiul embrionar. Așadar, citodiferențierea se deosebește radical de fenomene comparabile cum ar fi inducția enzima-

tică și sporulația la bacterii. Astfel, în cazurile din urmă, condiții de mediu reprezentate de prezența unui substrat nutritiv dat, sau expunerea la condiții proaste de creștere determină inducția unei enzime respectiv a sporulației dar după îndepărtarea acestor condiții de mediu sinteza enzimei sau a materialului formator de spori încetează. Dimpotrivă, de îndată ce a avut loc determinarea celulelor măduvei sau epidermei spre a produce celule sangvine și sinteza de hemoglobină sau celule ale pielii și sinteza de cheratină, aceste celule și toate acelea care derivă prin mitoză din ele sînt ireversibil determinate spre același fel de diferențiere.

Unul dintre cele mai importante aspecte ale citodiferențierii este controlul expresiei genice care poate fi exercitat la nivelul sintezei ADN prin replicare diferențiată, sinteză ARN prin transcriere diferențiată (genele care codifică proteinele specifice unui anumit tip celular sînt transcrise diferențiat) și prin traducere diferențiată (injectînd în ovule nefecundate de broască molecule de ARNm purificat ce poartă mesajul pentru sinteza hemoglobinei de iepure, se constată că, deși ovulele nicio dată nu sintetizează hemoglobină, avînd la dispoziție ARNm pentru aceasta, ele o sintetizează, ceea ce demonstrează că nu există un mecanism în celule care să prevină traducerea mesajelor pe care în mod normal nu le posedă; dar în acest caz intervine un control la nivelul traducerii acestor mesaje în sensul că vor fi traduse cu mai mare eficiență mesajele proprii, decît cele străine tipului celular considerat).

Moleculele de ARNm cu durată variabilă de viață au rol în controlul traducerii în dezvoltare și diferențiere. Diferite tipuri de ARNm cu durată scurtă de viață apar în celule în toate stadiile de diferențiere. Cu cît mai scurtă este durata de viață a unui ARNm, cu atît mai repede celula poate să reprezente mai ușor transcrierea aceluia ARNm. ARNm cu durată mijlocie de viață apare în celule mitotice active și inactive. În unele celule el este temporar depozitat în poliribozomi inactivi (cazul ARNm pentru keratina penei). În această categorie intră și ARNm pentru hemoglobina embrionară și ARNm pentru fibroina firului de mătase la *Bombyx mori*. ARNm de durată medie de viață este deci folosit spre a susține sinteza unor produși speciali care caracterizează celulele diferențiate.

ARNm cu durată lungă de viață se află în sporii procariotelor și eucariotelor care germinează după mulți ani de la formarea lor. La eucariote, acest tip de ARNm depozitat în semințe poate fi responsabil pentru sinteza proteinică din perioa-

da postgerminativă timpurie. În timpul germinării nu se sintetizează ARN. ARNm din unele semințe poate persista timp de secole (unele semințe găsite în vase antice au germinat după 1700 de ani). ARNm și de alte tipuri cu durată lungă de viață apar și în ovogeneza amfibienilor. ARNm de lungă durată de viață funcționează ca depozitar de informație necesară spre a susține o mare și rapidă creștere a cantității totale de protoplasmă (cazul semințelor) sau o desfășurare a dezvoltării timpurii (cazul sporilor și ovocitelor după inițierea metabolismului activ ce urmează după o perioadă de repaus la amfibieni).

Concluzia generală este că sinteza diferitelor tipuri de proteine în celulele aflate pe cale de diferențiere este reglată în principal la nivelul transcrierii, mai curînd decît la nivelul replicării sau traducerii.

Cum toate celulele au o aceeași cantitate de ADN și deci o aceeași informație genetică înseamnă că o celulă înalt specializată pentru îndeplinirea unei funcții particulare trebuie să-și blocheze toate genele cu excepția acelor care controlează funcția considerată și activitățile generale de întreținere. Aceasta nu înseamnă că genele blocate nu ar mai putea fi funcționale niciodată, ceea ce ar presupune degradarea permanentă a ADN corespunzător lor. Cele mai multe date experimentale sugerează că nucleii tuturor celulelor diferențiate continuă să poarte toată informația genetică prezentă în nucleul zigotic. Acest fapt a fost sugerat prin experiențele prin care s-a dovedit experimental totipotența celulei vegetale (experiențele au fost efectuate de Steward în 1970 în cadrul căroră a fost obținută o plantă întreagă de morcov dintr-o singură celulă floematică prelevată din țesuturi radiculare (fig. 73), ca și prin experiențele de transplant nuclear realizate de către J. Gurdon, la *Xenopus laevis*. Nucleii din celule diferențiate precum neuroni, hepatocite, celule intestinale, sînt injectați în ovule fecundate dar al căror nucleu a fost scos microchirurgical sau distrus prin iradiere UV (fig. 74 A, B). Din asemenea „hibridi“ nucleu-citoplasmă pot rezulta cu o frecvență anumită broaște perfect normale. În experiențele în care nucleul provine de la o linie heterozigotă $+ / O$ -nu (prezintă în nucleu un singur nucleol), iar citoplasma de la tipul normal (prezintă în nucleu doi nucleoli) s-au obținut indivizi care prezentau în nucleii celulelor doar cîte un singur nucleol. Astfel s-a dovedit că nucleii din celulele specializate continuă să poarte toată cantitatea de ADN, respectiv toată informația ereditară necesară pentru formarea unui întreg organism.

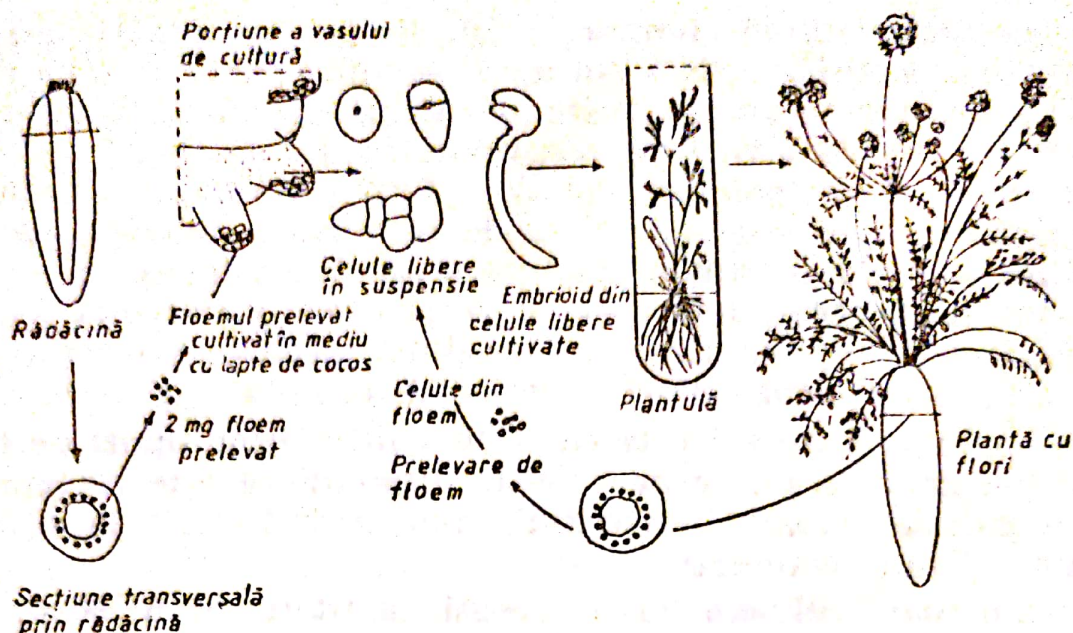


Fig. 73. Totipotența celulei vegetale floemate de morcov (după Steward, F. C., 1964).

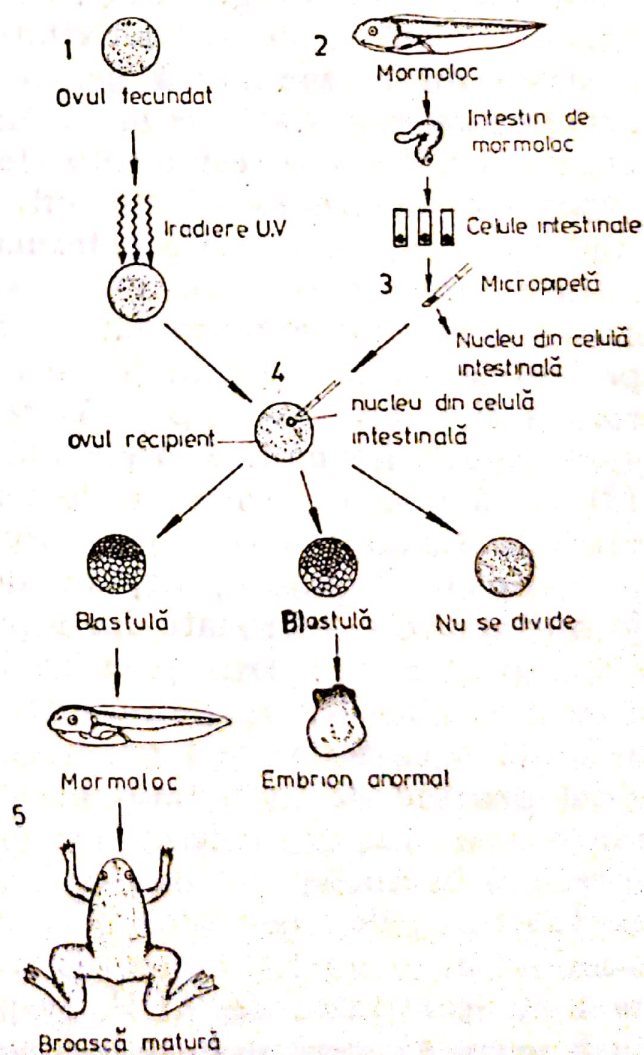


Fig. 74. A. Experiențele lui John Gurdon prin care a evidențiat totipotența nucleilor din celulele foarte specializate. Acești nuclei injectați în ovule enucleate determină dezvoltarea unei broaște adulte din genul *Xenopus laevis*.

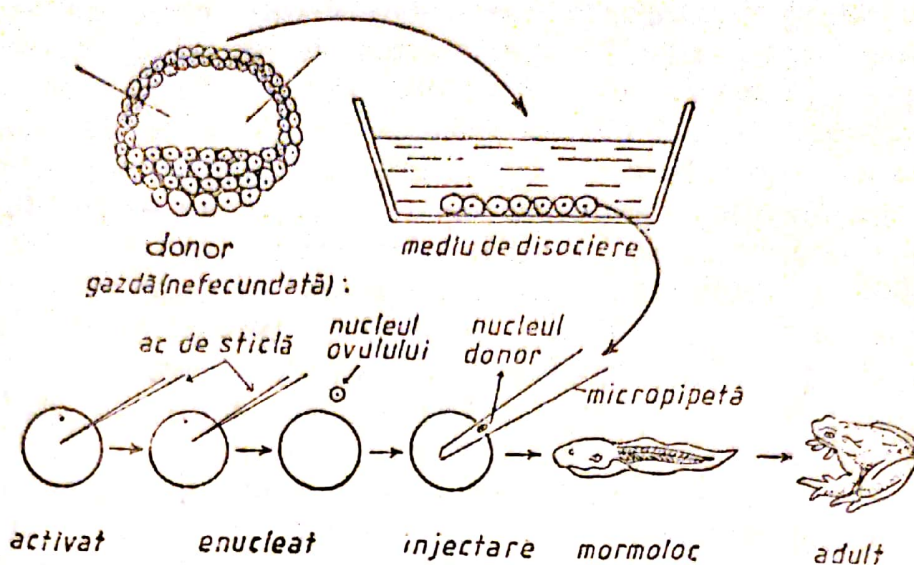


Fig. 74. B. Transplantarea de nucleu de la un donator în stadiul de blastulă la un ovul nefecundat. Ovulul gazdă a fost „activat” prin înțeparea cu un ac de sticlă spre a fi stimulată dezvoltarea și nucleul ovulului a fost eliminat (în multe experiențe nucleul ovulului este distrus prin iradiere UV). O celulă diploidă donatoare este apoi obținută prin disocierea țesutului donator în celule separate folosind versen sau tripsină. Una din celule este absorbită cu ajutorul unei micropipete care are un diametru mic încât rupe peretele celular, păstrând doar nucleul înconjurat de puțină citoplasmă, acesta fiind injectat în ovulul gazdă enucleat. Prin dezvoltarea sa ulterioară din acest ovul cu nucleu diploid transplantat va putea deriva un individ complet normal. (după Moore, J.A., 1972).

Numeroase experiențe au dovedit și rolul citoplasmei în diferențiere. În aceleași experiențe de transplant nuclear efectuate de către Gurdon s-a constatat că atunci când un nucleu nevoluminos care nu se află în diviziune, dintr-o celulă nervoasă, este injectat într-un ovul fecundat enucleat, el recapătă dimensiunea caracteristică nucleului unui ovul fecundat. Are loc creșterea intensității sintezei ADN și este reglată intensitatea sintezei ARN. Astfel citoplasma apare a avea o importanță excepțională în menținerea stării de diferențiere, prin aceea că în ea se acumulează o serie de molecule reglatoare prin care se întărește condiția diferențiată. Un nucleu străin introdus în citoplasma celulei diferențiate, prin transplantare sau fuziune celulară intră imediat sub influența reglatoare a citoplasmei gazdă. Se spune, figurativ desigur, că citoplasma „îi spune” nucleului ce să facă, în sensul că în ea se află componente capabile de a regla direct sau indirect transcrierea genică.

Genomul zigotului care cuprinde informația ereditară atât de origine paternă cât și de origine maternă începe să transcrie și treptat predomină asupra informației materne, depozitată în

ovul. Totodată are loc așa-numita determinare primară. Inițial, zigotul este totipotent în sensul că primele 2—4 celule rezultate prin diviziunea sa pot deveni embrioni de-sine-stătători dacă sînt separate. Dar pe măsură ce clivajul se desfășoară această capacitate de totipotență este pierdută și intervine mai întîi o determinare primară care direcționează celulele spre anumite specializări (ectoderm, endoderm, mezoderm). Odată realizată determinarea primară, să zicem endodermală, descendenții unei astfel de celule sînt supuși unor mecanisme mult mai fine de determinare care vor duce la o evoluție spre linii strict specializate cum ar fi linia celulară hepatică, linia celulară pulmonară, linia celulară pancreatică etc.

Se admite că determinarea primară are la bază acțiunea unor molecule determinative de natură proteinică sau ribonucleică prezente în citoplasma ovulului. Acestea ar exercita un fel de influențe materne care ar face prin concentrarea lor în diferitele regiuni ale zigotului să fie determinate primar diferitele celule rezultate în urma diviziunii zigotului.

La *Drosophila melanogaster* embriogeneza se desfășoară diferit de cea de la vertebrate. Analiza cazurilor de mozaicism sexual la drosofilă arată că în embriogeneza timpurie la această insectă apar evenimente de determinare foarte specifică. Cromozomii zigotului de drosofilă nu sînt angajați în sinteza de ARNm sau ARNr, din care cauză se consideră că în timpul formării blastodermului, citoplasma ovulului trebuie să conțină un mozaic de influențe materne care condiționează o determinare foarte specifică. Mozaicul sexual sau *ginandromorfismul* caracterizează indivizii care conțin un amestec de celule femele (XX) și masculine (XO) și apar în urma unei eliminări timpurii somatice a unui cromozom X dintr-un nucleu zigotic XX care se divide.

La *Drosophila melanogaster*, această eliminare este stimulată atunci cînd un cromozom X poartă o inversie care face ca acesta să capete formă inelară și astfel să fie instabil. La *D. simulans* acest lucru are loc la femelele homozigote pentru mutația *claret* (*ca*).

Prin încrucișarea unor masculi care poartă mutații recesive X-lincate (ochi albi, culoare galbenă a corpului) cu femele care poartă alele de tip sălbatic (normal) pot fi evidențiați indivizii *ginandromorfi* progeni căci trăsăturile recesive sînt exprimate în celule XO nu însă și în celulele XX (fig. 75).

Un eveniment de determinare timpurie care duce la apariția de fenotipuri particulare este determinismul cromozomal al

sexului. Cromozomul Y este esențial numai în unele etape definite în producerea de spermatozoizi funcționali deoarece s-a constatat că masculii XO au organe genitale normale dar sînt sterili. Dar și autozomii posedă informație care intervine în determinismul sexului, sexul fiind în ultimă instanță determinat de raportul autozomi. Există numeroase gene reglatoare care intervin în determinismul sexului. Sex-determinarea este un proces labil, sensibil la dereglări de natura anomaliilor în doza de gene autozomale.

La mamifere, în speță omul, embrionul rămîne într-o stare nediferențiată circa 5 săptămîni, termen la care alte primordii de organe îndeplinesc deja funcții diferențiate. În săptămîna a șasea, embrionii XY dezvoltă tubuli seminiferi în primordiile

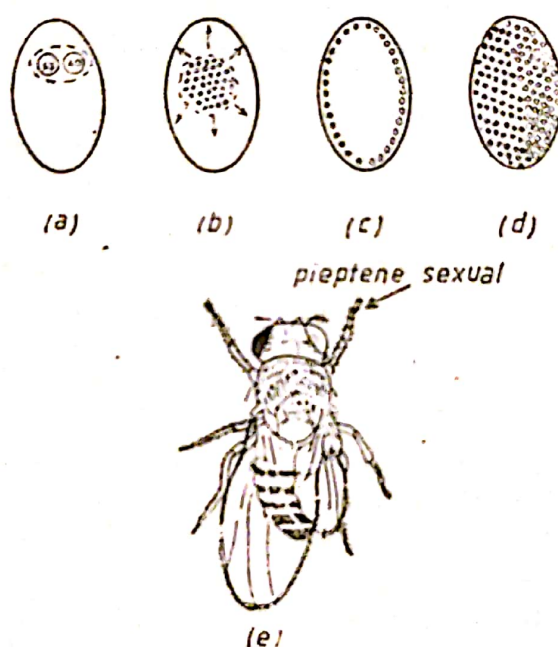


Fig. 75. Formarea unui ginandromorf la *Drosophila melanogaster* care are la bază un mozaic celular (celule cu doi cromozomi X și celule cu un cromozom X). În (a) formarea a doi nuclei din prima diviziune a zigotului. Un nucleu este XX, celălalt XO. Nucleii XX sînt reprezentați prin cercuri negre iar cei XO prin cercuri albe. Unul dintre cromozomii X din nucleii XX poartă alelele recesive mutante care dau culoarea alb-eozină a ochilor și aripi miniaturale, iar celălalt cromozom X poartă alelele dominante. Nucleii XO au pierdut cromozomul X ce purta alelele normale (dominante) păstrînd doar cromozomul X cu alelele recesive mutante. În (b) nucleul fecundat mai suferă încă două diviziuni mitotice, nucleii fii rezultați grupîndu-se în centrul zigotului. Apoi, acești nuclei migrează spre suprafața zigotului (c) unde mai suferă încă trei diviziuni. Suprafața blastodermului văzută din afară (d) prezintă un model de mozaicism celular pe baza căruia se va diferenția un individ ginandromorf. În (e) este reprezentată o musculiță adultă ginandromorfă cu fenotip sălbatic pe partea stîngă (heterozigotă) și fenotip dublu-mutant (ochi alb-eosin, aripă miniaturală) hemizigot pe partea dreaptă.

gonadale pe cînd gonadele XX rămîn încă nediferențiate și abia în a șaptea săptămînă apar foliculi în ovarul embrionar.

În determinarea sexului la mamifere, prezența sau absența cromozomului Y s-a dovedit a fi esențială. Genele plasate pe cromozomul Y al mamiferelor, puține ca număr diferit dar probabil în copii multiple funcționează numai o dată în cursul vieții unui mascul și anume în intervalul scurt din viața embrionară cînd embrionul nediferențiat virează spre sexul mascul.*

Dezvoltarea sexuală secundară masculă este condiționată de producerea hormonului testosteron de către celulele testiculare, iar cea femelă de producerea hormonilor oestrogeni de către celulele ovarului.

10.5. BAZELE GENETICE ALE REGLĂRII DE LUNGĂ DURATĂ

Dezvoltarea normală a unui organism eucariot complex presupune funcționarea secvențială a numeroase enzime în diversele tipuri celulare. Mutațiile genice care afectează procesele biochimice de bază își exercită efectul dăunător în stadiile esențiale ale dezvoltării. Zigoții homozigoți pentru asemenea gene mutante recesive deviază de la dezvoltarea normală într-un anumit moment apărînd alterări ale capacității de migrație a celulelor, în diferențierea lor și chiar moartea celulelor. Dacă supraviețuiesc, din zigot rezultă un individ cu fenotip defectiv. Mutația (deleția) *O-nu* în ADN nucleolar de *Xenopus* își manifestă efectul letal la embrionii homozigoți atunci cînd în dezvoltarea zigotului este necesară sinteză de ARNr.

Tot astfel, mutația *minute* de la *Drosophila*, este de timpuriu letală la homozigoți și are ca bază genetică deficiențe în genele ARNt.

La șoarece s-a descris locusul genic complex *T* în care se află o serie de alele reprezentate de gena normală de tip sălbatic „+”, o genă *T* mutantă, incomplet dominantă, și alelele recesive mutante *t*. Gena + este implicată în formarea cordamezodermului. Heterozigoți +/*T* se nasc cu cozi scurte:

* Produsul acestor gene desemnat *Mis* (de la Müller inhibitrice substance — substanța inhibitoare a canalelor Müller) condiționează involuția cordoanelor ce vor deveni canale Müller (la sexul femel) și dezvoltarea cordoanelor ce vor deveni canale Wolf (la sexul mascul). La embrionul determinat cromozomal XX, deci femel, simpla absență a cromozomului Y este suficientă spre a avea loc involuția canalelor Wolf și dezvoltarea canalelor Müller.

heterozigoții T/t se nasc fără coadă iar homozigoții T/T mor după 10 zile, pe când homozigoții t/t mor și mai devreme.

Alelele t și T aparțin unei gene a cărei activitate este deci esențială în dezvoltarea timpurie, dar nu se știe care este activitatea specifică, adică produsul genic al unei asemenea gene și acțiunea sa concretă.

La *Drosophila*, pe cromozomul X se află locusul *Notch*. Deficiențele în acest locus și mutațiile punctiforme determină apariția unui sindrom bizar la organisme hemizigote sau homozigote în care apare o creștere de 3 ori a dimensiunii sistemului nervos central pe seama nașterii de celule neuronale din celulele ectodermice care în mod normal ar fi dat naștere la piele, glande salivare și farinx.

Un aspect foarte evident al reglării activității genice la eucariote este oferit de manifestarea așa-numitului *efect de poziție*. Aceasta arată că localizarea relativă a segmentelor ADN în cromozom este un factor important în reglarea activității genice la eucariote.

La *D. melanogaster* când genele segmentului 16 A de pe cromozomul X sînt prezente într-o singură copie condiționează tipul normal (+) al dimensiunii ochilor. Prin duplicația acestui segment este condiționat fenotipul mutant *Bar* fiind afectată formarea omatidiilor. Femelele heterozigote pentru *Bar* ($Bar/+$) prezintă ochi cu dimensiune mai redusă față de tipul sălbatic. Masculii hemizigoți $B/\rightarrow$ și femelele homozigote B/B au ochi de dimensiune extrem de redusă. Prin crossing-over inegal la indivizii B/B rezultă în unele cazuri indivizi care poartă trei copii ale segmentului 16 A. Dacă indivizii B/B au în medie 68 omatidii per ochi cei $BB/+$ au numai 45 cu toate că cele două tipuri poartă același număr de segmente 16 A.

Rezultă că genele segmentului 16 A manifestă o acțiune diferită atunci când sînt în poziție trans B/B față de condiția cis $BB/+$ (fig. 76).

Segmentul 16 A al cromozomului politen X se află situat între segmentele 15 F și 16 B și prezintă 6 benzi. În stare nepolitenizată această porțiune a lui X este eucromatică. S-ar putea admite că segmentul poartă 6 gene active (1—6) și regiunea *Bar* a cromozomului poate fi astfel reprezentată 15 F — 123456 123456 — 16 B. Este posibil ca efectul dăunător asupra dezvoltării omatidiilor să apară totdeauna când gena 6 apare în vecinătatea unei copii a genei 1 în locul vecinului său obișnuit — reprezentat de prima genă din segmentul 16 B. Când apar două asemenea asocieri 6—1 efectul este și mai nociv.

Acesta a fost numit efectul de poziție ceea ce sugerează că localizarea relativă a segmentelor ADN într-un cromozom este un factor important în reglarea genetică a eucariotelor.

Efectul de poziție de tip *Bar* este un efect stabil. Dar la *Drosophila* mai există și un alt tip de efect de poziție denumit efect „V” caracterizat prin instabilitate și care se manifestă predominant prin variegare, care înseamnă că anumite celule prezintă un fenotip mutant pe când altele prezintă un fenotip normal din care cauză apare un individ mozaicat. Când apare o ruptură în heterocromatina constitutivă sau facultativă aceasta face ca prin translocatie sau inversie porțiunea heterocromatică să vină în contact cu regiunea eucromatică. Heterocromatina își exercită efectul său variabil: în unii nuclei reprezintă genele din eucromatină, pe când în alții nu le reprezintă. Astfel pot apare ochi în care se remarcă un mozaic al culorii roșu și alb.

Efect de poziție prin translocatia heterocromatinei a fost remarcat și la mamifere (șoarece) constatându-se că atât heterocromatina constitutivă cât și cea facultativă au aceleași proprietăți reglatoare.

Efectul de poziție ne arată că funcționarea genelor depinde nu numai de existența lor ca atare ci și de poziția lor pe cro-

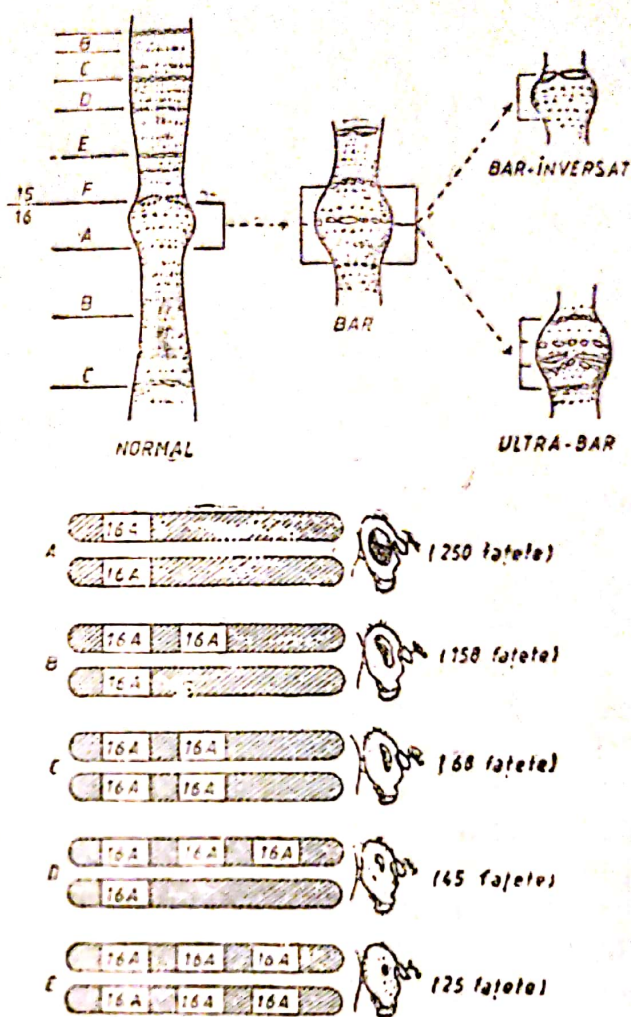


Fig. 76. Regiunea *Bar* a cromozomului (X) din glandele salivare de drosofilă. I. Duplicația benzilor la mutanta *Bar* (B/B) și *ultra-Bar* (BB/BB). II. Aranjamentele diferite ale secțiunii 16 A în cromozomul X de *D. melanogaster* și fenotipurile rezultate din aceste aranjamente. A, femelă de tip sălbatic. B, femelă *Bar* heterozigotă. C, femelă *Bar* homozigotă. D, femelă *Ultra-Bar* heterozigotă, arătând efect de poziție. E, femelă *ultra-Bar* homozigotă (după Levine, 1973).

mozom, de vecinătatea lor cu alte gene. Funcția unei gene se poate modifica nu numai prin modificarea structurii sale (mutație) ci și prin schimbarea vecinătății cu alte gene, adică prin plasarea sa într-un alt mediu genic.

Gena w^+ de la drosofilă, plasată pe cromozomul X și în regiunea 3 C₂ a cromozomului uriaș condiționează culoarea normală a ochilor — roșie — la tipul sălbatic. În urma unei inversii paracentrice, ea vine în apropierea centromerului și ochii devin mozaicați prezentînd zone alternative roșii și albe, fără a se fi modificat structural ci numai prin învecinarea sa cu regiunea heterocromatică constitutivă a centromerului. Astfel porțiunea eucromatică pe care se află gena w^+ se heterocromatinizează parțial și devine nefuncțională, comportîndu-se ca o genă recesivă w care condiționează culoarea albă a ochilor de drosofilă. Dacă un segment heterocromatic se interpune într-o regiune eucromatică el devine eucromatic iar genele sale devin funcționale, alterînd totodată expresia genelor din regiunea eucromatică.

Efecte de poziție au fost remarcate și la bacteria *E.coli*. Cu ajutorul fagilor transductanți s-au construit tulpini bacteriene în care genele structurale *lac* au fost aduse în vecinătatea operonului *trp* sau regiunilor operatoare *pur E* făcînd ca sinteza de β -galactozidază să fie sensibilă la concentrațiile intracelulare de triptofan sau purine, indiferent de concentrația de lactoză. Deci, elementele de control specifice pentru un set de gene pot să-și exercite controlul și asupra unui set de gene venite în vecinătatea sa prin transducție sau transpoziție.

Ca și în cazul bacteriilor funcționarea genelor eucariote poate fi condiționată de poziția lor pe cromozomi, *trans* sau *cis*. Astfel, la *D.melanogaster* există indivizi care prezintă ochi de culoarea caisei și prin analiză genetică s-a arătat că ei prezintă pe cromozom gena determinatoare *apr* în poziție *trans* ($apr^+w/apr w^+$). Dimpotrivă, atunci cînd cele două gene $apr^+ w^+$ se află în poziția *cis* ($apr^+ w^+/apr w$) ei prezintă ochi de culoare roșie. Explicația se bazează pe faptul că cele două gene w și *apr* sînt transcrise într-un același ARNm în poziția *cis* dar, la heterozigoți în poziția *trans*, genele se află pe cromozomi diferiți, fiind transcrise de molecule diferite de ARNm apărînd un fenotip modificat. Acesta a fost numit *efectul de poziție cis-trans*.*

* Aplicarea testului *cis-trans* în experiențe de complementație genică (două gene cu mutație în situri diferite concură la sinteza unui produs genic normal,, dacă sînt într-o aceeași celulă, pe cînd separate ele di-

10.6. ELEMENTE TRANSPOZABILE ȘI REGLAREA ACTIVITĂȚII GENICE

La porumb a fost evidențiată o clasă de elemente reglatoare genetice unice care pot să-și modifice localizarea în genom, într-o generație fiind pe un cromozom și la aceeași linie, dar în altă generație fiind găsit într-o altă poziție pe același cromozom sau chiar pe un alt cromozom. Acestea sînt deci elemente genetice transpozabile. Ieșirea dintr-o poziție cromozomală și intrarea într-o nouă poziție cromozomală pot fi însoțite uneori de o creștere a frecvenței de fragmentare a cromozomului.

Printre elementele transpozabile la porumb s-a descris *locusul disociator* (D_s) -activator (A_c). Integrat într-o poziție dată a cromozomului, elementul D_s reprezintă genele adiacente de o parte și de alta a sa, determinînd apariția în fenotip de aspecte de variegare. Se presupune că elementul D_s ar fi un segment de heterocromatină avînd proprietatea de a se insera în diferite puncte ale cromozomului sau cromozomilor. Efectul represiv exercitat de către elementul D_s asupra eucromatinei adiacente este dependent de prezența în genom a altui element numit activator (A_c) care nu are prin el însuși efect asupra genelor cu care se învecinează dar și el suferă transpoziție. Acumularea unui număr mare de elemente A_c are efect represiv asupra lui D_s . Nu se cunoaște natura exactă a acestor elemente. Se crede că D_s ar fi un element de control analog unui operator instabil iar interrelația A_c — D_s este imaginată ca un relict al unei interdependențe cîndva normale reglator-operator.

Tot un element de control apare și elementul *dotted* (D_t) care condiționează apariția de pete colorate pe suprafața incoloră a cariopsei și care influențează gena ce dirijează sinteza unei proteine implicate în biosinteza antocianinei.

Elemente de control transpozabile au fost descrise și la bacterii sub numele de elemente de inserție (IS). Ele se inseră în plasmide bacteriene, trec apoi pe cromozomul bacterian și din nou pe plasmide afectînd genele implicate în rezistența la antibiotice, ca și alte gene*.

Dirijează sinteză de produși genici alterați) la fagul T_4 a permis lui S. Benzer (1957) să definească gena drept unitate de funcție — cistron — care dirijează sinteza unei catene polipeptidice. Ea are însă mai multe subunități de mutație (mutoni) și de recombinare (reconi) a căror dimensiune minimă poate fi perechea de nucleotide.

* Aceste IS-uri sînt în număr de patru și au lungimi cuprinse între 700 și 1400 perechi de nucleotide. Odată cu desprinderea lor, ele pot antrena și gene dintr-un anumit sit al cromozomului pe care să le in-

10.7. REGLAREA DISTRIBUIRII GENELOR ÎN CURSUL DIVIZIUNII CELULARE

Diviziunea apare ca cel mai important eveniment din viața celei care asigură continuitatea fenomenului ereditar. Este firesc ca desfășurarea sa să cadă sub incidența unor fine mecanisme de reglaj.

La procariote replicarea cromozomului bacterian este sincronizată cu activitatea unei porțiuni din membrana celulară la care acesta este atașat. În distribuția produșilor de replicare în celulele fiice intervine mezozomul, formațiune derivată din membrana celulară. Există o strictă coordonare între replicarea ADN, sinteza de membrană celulară, diviziunea mezozomului și formarea septumului ce separă celulele fiice. Orice dereglare în desfășurarea acestor evenimente este însoțită de o repartizare neechilibrată a genomului în celulele fiice cu apariția de minicelule sau de celule polienergide, aspecte remarcate atât la bacterii cât și la algele albastre (Gavrilă, 1978).

Existența unor mecanisme genetice care guvernează diviziunea celulară la algele albastre este dovedită și de experiențele efectuate de Gavrilă și Mihăescu 1981, în care s-a urmărit efectul nitrosoguanidinei asupra algelor albastre-verzi, *Nostoc* și *Synechococcus*, prima filamentoasă, a doua unicelulară. Nitrosoguanidina acționează preferențial pe bifurcația de replicare; în urma acțiunii ei apar la *Nostoc* modificări notabile în planul de diviziune care duc la apariția de forme cruciform ramificate, modificarea planului de diviziune cu apariția de grupe celulare, ca și represia diferențierii de necrociste, celule prin a căror autoliză duc la fragmentarea filamentului uniseriat în trichome de câte 10—20 celule. Prin aceasta rezultă filamente uniseriate care cuprind între 500—1000 celule ceea ce ar putea fi analog cu fenomenul diviziunii anarhice de la eucariote în cazurile de transformare malignă.

La eucariote, complicarea organizării genomului a dus la diferențierea unui mecanism mult mai perfecționat de distribuire echilibrată a genelor, orice dereglare din acest punct de vedere avînd consecințe mult mai drastice asupra supraviețuirii celei.

Existența unui mecanism de reglare a diviziunii celulare este remarcată în cazurile în care în urma unor mutații apar

sere într-un alt sit, afectînd astfel expresia genică. Gena transpozată împreună cu IS-ul corespunzător formează o unitate de transpoziție numită TRANSPOZON.

dereglări în desfășurarea sa. Astfel în cazul unei translocatii dintre cromozomul 22 și cromozomul 9 din complementul cromozomal uman trecerea unui fragment de la cromozomul 22 la cromozomul 9 duce la apariția unui *cromozom marker* 22 cu un braț mai scurt, numit încă cromozomul *Philadelphia* — semnul cel mai sigur al leucemiei mieloide în care diviziunea celulară se desfășoară anarhic. Cea mai simplă explicație dată în acest caz poate admite că pe fragmentul translocat se află gena care condiționează desfășurarea normală a diviziunii, la rîndul său aflată în sfera de acțiune a unui element de control. Translocată, avînd o nouă vecinătate genică această genă nu mai cade în sfera elementului de control și funcționează după un model comparabil cu funcționarea operonului în cazul mutațiilor în gena represoare.

Mecanismul de reglare a diviziunii meiotice este încă și mai complicat. Meioza este desemnată să asigure distribuirea echilibrată a genelor în gameți dar totodată și recombinarea genetică. În ambele cazuri evenimentul esențial este sinapsa cromozomală, adică împerecherea exactă, genă la genă, cromomeră la cromomeră a cromozomilor omologi de origine maternă și de origine paternă. O împerechere exactă și normală asigură și o disjunție exactă a perechilor de cromozomi. În ultimă instanță se realizează reducerea numărului de cromozomi în gameți care vor avea o garnitură haploidă de cromozomi. În stadiul de pachiten al meiozei se realizează și schimbul reciproc de gene între cromozomi omologi (crossing-overul). Existența unui mecanism de reglare a desfășurării evenimentelor din meioză este dovedită de comportamentul meiotic al unor linii aneuploide de grîu. *Triticum aestivum* — grîul comun — este un amfiploid natural al cărui complement cromozomal (AA, BB, DD) este de origine triplă, provenind de la trei specii diferite A, B, D (*Triticum monococcum* sau *T. urartu*, *Aegilops speltoides* și *A. squarrosa*). La formele hibride în meioză nu se realizează împerecherea cromozomilor datorită neomologiei lor, speciile participante în încrucișare fiind neînrudite și în acest caz hibrizii din prima generația sînt sterili. Prin dublarea numărului de cromozomi se creează posibilitatea împerecherii de cromozomi în cadrul fiecărui complement cromozomal și atunci hibrizii devin forme amfiploide cu o desfășurare normală a meiozei și cu recăpătarea fertilității. Cînd însă formele care participă la formarea hibridului sînt oarecum înrudite, prezentînd o omologie parțială numită și homeologie este posibil să aibă loc nu numai împerecherea de cro-

mozomi ce aparțin aceluiași complement cromozomal cu formare de bivalenți dar și împerecheri de cromozomi homeologi cu formare de multivalenți, existînd însă și posibilitatea ca unii cromozomi să rămînă neîmperecheați ca univalenți. Repartizarea echilibrată a cromozomilor în gameți este condiționată de împerecherea lor sub formă de bivalenți. Multivalenții și univalenții nu asigură un asemenea deziderat. Griul comun este un amfiploid tipic prezintă cei trei genomi A, B, D homeologi. Conform comportamentului meiotic general al acestor forme hibride ne-am aștepta ca în timpul meiozei să apară pe lîngă bivalenți și multivalenți și univalenți. Dar se constată că *T.aestivum* se comportă în meioză ca un diploid tipic cu formarea de asocieri bivalente de cromozomi. Deci, în evoluția sa a avut loc un fenomen de diploidizare naturală a hibridului poliploid. Studiul meiozei formelor aneuploide monosomice ($2n-1$) sau nulisomice ($2n-2$) pentru perechea 5 B de cromozomi de la *T.aestivum* a arătat că în aceste cazuri lipsa unuia sau a ambilor cromozomi ai acestei perechi 5 din genomul B este însoțită de o dereglare a meiozei cu formarea de asociații multivalente sau cu apariția univalenților. Acest comportament meiotic anormal a fost explicat admițîndu-se că pe cromozomul 5 B se află o genă Ph care previne împerecherea homeologilor. În absența sa, prin lipsa cromozomului 5 B meioza se desfășoară neregulat cu formarea de asociații multivalente și univalente care vor condiționa o repartizare neechilibrată a cromozomilor în gameți. Rezultă gameți aneuploizi ale căror fertilitate și vitalitate sînt reduse, unii fiind sterili și nefuncționali. Mecanismul diploidizării naturale a amfiploidului *T.aestivum* a jucat un rol esențial în progresul civilizației umane, asigurînd fertilitatea uneia dintre cerealele esențiale ale omenirii. Și la *Avena sativa*, pe cromozomul 7 s-a decelat o genă a cărei acțiune este asemănătoare genei Ph de la grîu.

Cazuri de comportament cromozomal anormal în meioză sînt descrise și la om în care poate avea loc o nondisjuncție cromozomală care afectează atît autozomii cît și heterozomii. Nondisjuncția unei perechi de cromozomi în meioză se poate datora diferiților factori mutageni, fizici, chimici, biologici (virusuri) sau chiar dereglărilor interne hormonale. Ovocitele umane sînt în mod deosebit ținta unor asemenea influențe care se pot acumula într-o viață de om, dat fiind faptul că încă din primele zile de viață acestea rămîn într-un stadiu de diploten meiotic care, fiind atît de prelungit, a fost numit *dictioten*. Nondisjuncția cromozomilor autozomi din perechea 21 (fig. 77)



Fig. 77. Placă metafazică cu asociere de cromozomi acrocentrici (săgeata). Mutațiile care afectează genele responsabile de reglarea diviziunii celulare alterează separarea normală a cromozomilor. $\times 5\,000$ (după L. Gedda și G. Brenci, 1974).

condiționează manifestarea sindromului Down (mongoloidismul) cu tot cortegiul de malformații și dereglări. Prezența unui cromozom suplimentar în perechea 21 (trisomia 21) în acest caz este corelată cu dereglări în însăși desfășurarea mecanismului mitotic căci și în *sindromul Down* apar frecvente leucemii. Nu este exclus deci ca diviziunea celulară să fie contralată multigenic. O doză suplimentară a unei asemenea gene reglatoare a mitozei ar putea să aibă efecte negativ remarcabile.

Nondisjuncția cromozomilor de sex duce la apariția de sindroame caracteristice grave la bărbat (XXY-Klinefelter) și la femeie (XXX-superfemelă; XO — *sindrom Turner*). Iată de ce desfășurarea evenimentelor genetice în cadrul diviziunii celulare cere un fin reglaj genic.

Capitolul IX

PROCES MUTAGEN ȘI RECOMBINARE GENETICĂ

I. PROCES MUTAGEN

1. GENERALITĂȚI

Genele se caracterizează prin mutabilitate — care reprezintă capacitatea lor de a suferi mutații — schimbări permanente, detectabile, de regulă neprogramate, adică necodificate și care apar în esență în urma acțiunii unor agenți mutageni. Aceste schimbări se moștenesc de la o generație la alta și nu se datoresc efectelor recombinării sau segregării factorilor ereditari. La nivel molecular, mutația reprezintă schimbări în secvența de nucleotide din ADN.

Mutațiile sînt schimbări relativ rare, neobișnuite, căci materialul ereditar prezintă în mod normal o structură care face să fie protejat față de apariția schimbărilor neprogramate. Astfel, structura bicatenară și complexarea sa cu proteinele bazice conferă ADN-ului stabilitate antimutațională.

Detectarea mutațiilor este facilitată de consecințele lor fenotipice precum: modificarea activității polimerazelor de a cataliza replicarea acizilor nucleici, datorită mutațiilor ce apar în genele care intervin în replicare, transcriere sau reglare, schimbarea *fingerprintului* electroforetic, cromatografic sau spectrofotometric al ADN datorită mutației genelor ce dirijează sinteza enzimelor de modificare normală (metilare, hidroxilare, glucozilare etc.), creșterea ratei erorilor în replicare și transcriere, modificarea conținutului de aminoacizi al unei polipeptide ca urmare a modificării informației genetice primare (codonii din ADN) de la nivelul genei ce codifică polipeptida sau din genele ce codifică ARNt, aminoacil-ARNt, proteinele

ribozomale sau ale celorlalți factori care intervin în traducerea corectă a mesajului genetic.

Detectarea mutațiilor este indirectă, prin efectul lor fenotipic. Perfecționarea tehnicilor de secvențiere va permite detectarea directă a mutațiilor la nivelul secvenței ADN. Actualmente se elaborează metodologiile unei „genetici reversate” prin care se provoacă modificări dorite în secvența de baze azotate urmărindu-se apoi efectul lor fenotipic.

Mutația conduce la apariția de proprietăți principial noi în structura și funcția materialului genetic.

Sucesiunea de evenimente care pornește de la acțiunea mutagenului și ajunge la mutație poartă numele de mutageneză.

Capacitatea unei substanțe de a determina apariția unei mutații se numește capacitate mutagenă. O asemenea substanță se numește mutagen. Mutagenul reprezintă de fapt orice agent fizic, chimic sau biologic care determină o creștere marcantă a frecvenței de mutație comparativ cu nivelul general al mutației spontane a cărei cauză este nedefinită. Nu există o diferență de esență între mutația spontană și cea indusă, multe mutații spontane putând apare ca urmare a producerii și acumulării intracelulare de mutageni și antimutageni, componente ale mediului intern, ca și o consecință a tranzițiilor tautomere. Prin agent antimutagen se înțelege orice substanță care determină reducerea ratei de mutație spontană sau indusă, acționând fie ca protector, fie ca agent care facilitează repararea leziunilor premutaționale din ADN.

Antimutagenii au efect antagonist față de mutageni. Astfel, la *E.coli* adenina și derivații purinici apar ca mutageni pe când ribonucleozidele purinice precum adenzina și guanozina acționează ca antimutageni.

Există de asemenea ADN polimeraza mutatoare și antimutatoare. Primele cresc de pînă la zece ori rata de mutație spontană produsă în timpul replicării, pe cînd cele din urmă o reduc. Ele apar în urma mutației genelor care dirijează sinteza lor. Asemenea ADN polimeraze mutatoare și antimutatoare au fost găsite la fagul T₄. Din limfocite leucemice umane s-a izolat de asemenea o ADN polimerază mutatoare.

Cisteina, cistina, acidul giberelic etc. determină descreșterea frecvenței de aberații cromozomale induse cu raze X (Gottschalk, 1979) din care cauză au fost numite radioprotectori. Efectul lor cel mai puternic apare cînd sînt administrate în stadiul presintetic al ciclului celular. Sînt și alte substanțe anti-

mutagene. Astfel nitratul de cadmiu determină o descreștere cu 35—75% a efectului mutagen al etileniminei. Azida de sodiu are pe lângă efect mutagen în unele sisteme biologice și un efect antimutagen în alte sisteme biologice. De asemenea, păstrarea îndelungată a semințelor tratate cu mutagen poate avea efect antimutagen. Pe de altă parte, semințele păstrate mult timp prezintă un procent mai mare de aberații cromozomale. Păstrarea semințelor de orz tratate cu mutagen pe o perioadă de 4 săptămâni la o umiditate de 30% a determinat refacere leziunilor induse cu etilmetansulfonat sau dietilsulfat. Când însă procentul de umiditate a fost de 20%, frecvența leziunilor a fost mult mai mare.

Individul purtător al unei mutații ereditare poartă numele de mutant. Mutația poate afecta gena (mutație genică), cromozomul (mutație structural-cromozomală), genomul (mutație numeric cromozomală sau genomică) sau determinanții ereditari citoplasmatici (mutație extranucleară).

În cazul mutației genice dacă are loc modificarea unui singur nucleotid din secvența genică apare așa-numita *mutație punctiformă*. Mutațiile care apar în celulele reproducătoare se numesc mutații gametice, pe când cele apărute în celulele somatice se numesc mutații somatice. Mutația care prezintă o noutate față de tipul normal (sălbatic) se numește *mutație progresivă* sau *mutație înainte* (forward mutation), pe când mutația care readuce un tip mutant la tipul normal, inițial, poartă numele de *mutație regresivă*, sau *mutație înapoi* (back mutation).

După manifestarea lor mutațiile sînt expresive, care prezintă cel mai mare și evident efect fenotipic și neexpresive sau variabile, a căror expresie variază mult chiar în aceleași condiții de mediu. După mărimea efectului fenotipic, mutațiile se clasifică în micromutații (schimbările fenotipice fiind limitate pot fi remarcate numai prin metode statistice aplicate la grupe mari de organisme) și macromutațiile (schimbările fenotipice sînt mari, evidente, putînd fi remarcate chiar cu ochiul liber). Micromutațiile, afectînd fertilitatea și viabilitatea organismelor, au jucat și joacă un rol foarte important în evoluție, ele stînd la baza evoluției intraspecifice — speciației. Considerînd viabilitatea mutațiile pot fi letale, subletale sau semiletale și viabile. Mutațiile letale condiționează moartea organismelor chiar din momentul apariției lor. Mutațiile semiletale permit supraviețuirea un timp oarecare a organismului mutant.

Hemofilia la om reprezintă o mutație semiletală legată de cromozomul X.

După manifestarea lor în fenotip (exteriorizare) mutațiile sînt dominante și recesive. Mutațiile dominante sînt mai rare. Ele se manifestă chiar dacă sînt în prezența alelei normale care în acest caz este recesivă. Altfel caracterele tipului normal (sălbatic) sînt condiționate de regulă de gene dominante.

Cele mai frecvente sînt mutațiile recesive. Ele derivă din trecerea sub acțiunea mutagenului a genei dominante (A) în alela sa recesivă (a). Dacă procesul mutațional direcționat $A \rightarrow a$ este continuu desfășurat — aspect care s-a numit presiunea mutației — va avea loc înlocuirea lui A cu a , populația trecînd de la o condiție homozigot dominantă AA la o condiție homozigot recesivă aa . Mutația poate fi $A \rightarrow a$ și este o mutație progresivă (înainte) dar poate avea loc și în sensul $a \rightarrow A$ și atunci este o mutație regresivă (înapoi). Din această cauză, dar mai ales a încrucișărilor $AA \times aa$ într-o populație panmictică condiția homozigotă este rareori sau niciodată realizată. De asemenea, dacă mutația alelei A este desfășurată în mai multe sensuri $a_1, a_2, a_3, \dots, a_n$ apare fenomenul de alelism în trepte descris de N. P. Dubinin, rezultînd serii polialele de tipul aceleia pentru culoarea ochilor la drosofilă.

Mutațiile care apar într-o celulă somatică a unui organism pluricelular pot fi trecute prin diviziune, celulelor fiice, rezultînd o zonă mutantă pe un asemenea organism (șuviță de păr alb la un individ cu păr castaniu sau negru).

Mutațiile care apar în linia germinală a organismelor ce se reproduc pe cale sexuată sînt transmise prin gameți la generațiile următoare, făcînd să apară indivizi la care mutația să se manifeste atît în celulele somatice cît și în celulele germinale.

Organismul mutant poate fi definit numai în comparație cu tipul normal din care a derivat și care se întîlnește ca atare în natură (tip sălbatic). Mutațiile pot fi vizibile, în special cele morfologice și de culoare, sau invizibile, afectînd capacitatea nutrițională sau metabolică de a produce un aminoacid, o nucleotidă sau un zahar esențial pentru creștere. Asemenea mutații se numesc mutații biochimice. Descrierea unei mutații se realizează cu o mare precizie dacă se stabilește markerul genetic — adică o genă mutantă cu localizare cunoscută și efect fenotipic evident. Asemenea markeri genetici sînt de mare utilitate în studiile genetice.

Unele mutații afectează organismul cînd acesta este menținut sub un anumit regim de creștere dar nu și atunci cînd este menținut sub un alt regim de creștere. Acestea s-au numit mutații condițional letale. De exemplu, unele mutante de acest tip pot crește la o temperatură de 20°C numită temperatură permisivă, dar nu și la temperatura de 37°C numită temperatură restrictivă. Acestea sînt mutante *condiționale termosensibile*. Altele prezintă sensibilitate pentru alți factori fizici sau chimici.

Mutațiile letale determină direct moartea organismelor sau împiedică reproducerea lor prin alterări în sistemul reproducător (sterilitate) și aceste aspecte au fost definite generic cu termenul de moarte genetică.

Mutațiile de nutriție duc la conferirea caracterului de auxotrofie pentru anumite elemente nutriționale esențiale. Ele sînt recesive comparativ cu tipul normal numit prototrof.

Alte mutante, mai ales la microorganisme sînt de rezistență sau de dependență față de anumite antibiotice, tipul normal fiind sensibil față de acești compuși. Există de asemenea mutante bacteriene rezistente la fagi, tipul normal fiind de regulă sensibil.

Mutația presupune tranziția de la o stare premutațională la o stare mutațională propriu-zisă. O asemenea transformare a stării premutaționale în stare mutațională propriu-zisă este decisă în timpul replicării ADN și reparării sale postreplicative.

În raport cu adaptarea la mediu, mutația are caracter înțimplător: ea poate fi folositoare, dăunătoare sau neutră față de o stare actuală a mediului și caracterul său se poate schimba în condițiile unei stări mezologice viitoare, cînd o mutație favorabilă devine nefavorabilă și viceversa sau o mutație neutră poate căpăta un anumit sens.

Probabilitatea cu care la nivelul unui individ biologic are loc un anumit eveniment mutațional, în timpul unei generații (ciclu reproductiv) se numește rata mutației, exprimată cel mai adesea prin frecvența mutației.

Distribuția frecvenței mutațiilor induse sau spontane la nivelul diferitelor gene ale genomului sau al diferitelor situri din interiorul unei gene reprezintă spectrul mutațiilor. El prezintă specificitate de mutagen, acesta din urmă putînd reacționa selectiv cu anumite baze dînd așa-numitele „pete fierbinți mutaționale“.

Orice sit la nivelul secvenței nucleotidelor din cadrul unui locus genic care este foarte mutabil, fie în direcția înainte $A \rightarrow a$, fie în direcția înapoi $a \rightarrow A$ se numește o *pată caldă mutațională*. De regulă, aceste pete calde reflectă înlocuiri de nucleotide și în același timp regiunile din ADN la nivelul cărora interacțiunile dintre nucleotide adiacente facilitează sau nu înlocuirile de nucleotide. Cea mai mică unitate de mutație este perechea de nucleotide (muton).

Siturile mutaționale reprezintă pozițiile din macromolecula ADN sau cromozom la nivelul cărora apar mutațiile. Ca și ordinea genelor pe cromozom, ordinea siturilor mutaționale separabile prin crossing-over este strict liniară. O genă medie conține 500—1000 asemenea situri mutaționale a căror ordine liniară și distanță recombinatională corespunde ordinii și distanței dintre aminoacizii înlocuiți în catena polipeptidică specificată de gena considerată. Aceasta este dovada colinearității genă-enzimă.

Mutația genică este ultima sursă a variabilității genetice și totodată una dintre forțele primare ale evoluției, reprezentând sursa de material nou pentru selecție și materie primă pentru desfășurarea driftului genetic sau recombinării.

Cînd în urma acțiunii selecției naturale valoarea adaptativă a mutantului se dovedește a fi mai mică față de aceea a tipului normal (sălbatic) formele mutante vor fi eliminate din populație. Cînd însă valoarea adaptativă a mutantului se dovedește a fi mai mare pentru condițiile în care a apărut mutația genică, atunci el va înlocui treptat tipul normal. Cînd în unele condiții valoarea adaptativă a mutantului este mai mare, dar în alte condiții este mai mică selecția va păstra un echilibru determinat între tipul mutant și cel normal. Sînt unele gene care produc o creștere generalizată în rata de apariție a mutațiilor spontane. Aceste gene au fost numite de către Demerec în 1937, *gene mutator*. Totodată s-au descris de către Drake și Allen în 1968 *gene antimutator* reprezentînd orice genă mutantă care reduce rata de mutație. Astfel, au fost descrise gene care represează atît erorile de replicare cît și erorile de încorporare. Atît genele mutator cît și genele antimutator afectează activitatea enzimatică a ADN polimerazei, demonstrînd rolul acestei enzime în determinarea ratei de mutație spontană.*

* Trecerea de la starea premutațională la cea mutațională cu stabilizarea mutației este dependentă și de gradul de eficiență a mecanismelor ce intervin în procesul reparator. Procesul reparator este un proces

2. AGENȚI MUTAGENI

2.1. AGENȚI MUTAGENI FIZICI

a. *Radiația ultravioletă (UV)*. Este un component normal al atmosferei. Acizii nucleici absorb radiația UV cu un maximum localizat la 2600 Å. Radiația UV nu are proprietăți ionizante dar poate produce o stare excitantă a moleculei nucleotidice în care electronii capătă o energie mai mare și astfel se pot mișca mai ușor în poziții tautomerice instabile. Aceasta ar putea fi una din cauzele mutației spontane. Ionizarea bazei în timpul replicării ADN poate fi cauza tranziției *tautomere*. Ea implică pierderea hidrogenului de la azotul 1 al bazei. În starea sa ionizată T se poate împerechea cu G aflată în stare obișnuită. Tot astfel G în forma tautomeră se poate împerechea cu T în stare ionizată. Al doilea efect al iradierii UV este formarea dimerilor pirimidinici în special de timină. Aceștia de regulă sînt fotoreactivați, excizați sau reparați prin procesul recombinatoriu postreplicativ astfel că este împiedicată fixarea mutației. Dar apar, mai ales atunci cînd intensitatea iradierii este mare, greșeli în reparare. Cea mai frecventă eroare este aceea care operează după ce o catenă care conține dimerul a fost replicată iar catena fiică conține un gol opus dimerului. În acest caz intervine mecanismul de reparare recombinatională despre care se știe foarte puține lucruri și care poate să se desfășoare și el cu erori reprezentate de tranziții sau transversii.

b. *Radiațiile ionizante*. Radiațiile ionizante cuprind atît radiații corpusculare (*electroni, protoni, neutroni, deuteroni, particule alfa*) cît și radiații *electromagnetice* de mare energie precum *razele gamma* și *razele X* (Roentgen). Caracteristica lor

complex în care intervin enzime de fotoreactivare ce asigură conversia dimerilor de timină — ce rezultă din unirea covalentă a două resturi de timină adiacente pe o aceeași catenă ADN sub acțiunea iradierii cu ultraviolete — în resturi timină normale, apoi enzime de excizie și reparare postreplicativă (cînd este excizat segmentul de ADN afectat de mutație și folosindu-se catena intactă ca matriță este sintetizat un segment normal, sub acțiunea ADN-polimerazei I, urmînd ca ADN-ligaza să restabilească continuitatea covalentă a acestui segment la catena reparată și enzime de reparare prin recombinare cu formare de heteroduplex care vor fi convertit în homoduplex. În ultimul timp s-a descris și un sistem S.O.S. de reparare, predispus la erori (Antohi și Gavrilă, 1981). În procesul de reparare a ADN un rol important îl joacă ADN polimeraza I care efectuează un control al replicării corecte, eliminînd prin acțiunea sa exonucleozică bazele greșit împerecheate în procesul de replicare (Antohi și Gavrilă, 1981).

esențială este capacitatea de a determina apariția unei perechi de ioni într-un mediu absorbant. Substanțele care absorb energia unor asemenea modificări chimice sînt proteinele și acizii nucleici. Încă din 1927 Müller a evidențiat efectul mutagen al razelor X la drosofilă, el fusese însă semnalat din 1925 la ciuperci de către Nadson. În 1928 Stadler evidențiază efectul mutagen al razelor X la porumb.

Cele mai comune efecte ale iradierii sînt fragmentările de cromozomi sau de cromatide. Asemenea radiații mai au și o acțiune indirectă, radio-chimică manifestată prin transformarea apei în peroxizi de hidrogen și aceștia, la rîndul lor, își exercită acțiunea nocivă asupra materialului genetic. În urma acțiunii radiațiilor ionizante apar mutații genice și structural cromozomale.

2.2. AGENȚI MUTAGENI CHIMICI

Pentru prima dată s-a evidențiat efectul mutagen al unor substanțe chimice în anul 1943 la uretan și iperită.

Cei mai cunoscuți mutageni chimici sînt analogii bazelor azotate, agenții alkilanți, antibioticele etc.

Din grupa analogilor bazelor azotate fac parte 5-bromouracilul, 5-clorouracilul, 5-iodouracilul, 2-bromodeoxiuridina, 2-aminopurina.

Încorporați în noile catene de ADN în timpul replicării analogii bazelor azotate determină tranziții de tip $AT \rightarrow GC$.

Sub forma imină, 2-aminopurina (2-AP) se împerechează cu citozina în mod obișnuit ea împerechindu-se cu timina. Are loc tranziția $AT \rightarrow GC$.

Studiile privind acțiunea mutagenă a 5BU efectuate de către Benzer și Freese asupra regiunii rII a fagului T_4 au arătat că acesta determină nu mutageneză generală ci mutații la anumite situri și cu o frecvență caracteristică. Prin acțiunea aceluiași substanțe cum ar fi 2-amino-purina și 5 bromodeoxiuridina asupra mutațiilor produse de ele înșile, apar reverși spre tipul sălbatic. S-a sugerat că analogii bazelor azotate cauzează mutații prin determinarea de greșeli de împerechere de tipul greșelilor de încorporare și greșelilor de replicare.

O proprietate importantă a analogilor bazelor azotate este aceea că aceștia sînt capabili ca producînd tranziții bidirecționale $AT \rightarrow GC$ și $GC \rightarrow AT$ să determine reversia mutațiilor pe care le produc restaurînd exact, printr-o a doua mutație, sec-

vența inițială de baze. Dacă secvența inițială a fost CATCAT mutația va determina tranziția CAACAT iar revertantul va fi CATCAT.

Acidul nitros are ca efect dezaminarea nucleotidelor înlocuind gruparea amino ($-\text{NH}_2$). În locul acesteia rămâne gruparea keto ($\text{C}=\text{O}$). Prin dezaminarea citozinei rezultă uracilul iar prin dezaminarea adeninei rezultă o nucleotidă mai puțin comună care s-a numit hipoxantină (HX).

Prin dezaminarea citozinei poate avea loc o tranziție $\text{GC} \rightarrow \text{AT}$.

Prin dezaminarea guaninei rezultă xantina.

Hipoxantina se aseamănă cu G și se poate împerechea cu C, ducând la tranziția $\text{AT} \rightarrow \text{GC}$.

Xantina, produsul dezaminării oxidative a guaninei, manifestă proprietăți de împerechere asemănătoare tot guaninei și nu adeninei. Din această cauză xantina se va împerechea cu citozina dar nu prin trei ci numai prin două punți de hidrogen.

Hidroxilamina are efect mutagen numai când acționează asupra citozinei, putând fie să atace grupa amino în poziția 6 a citozinei (convertind-o într-o oximă ($=\text{N}-\text{OH}$) și rezultând un nucleotid modificat care se poate împerechea cu A) fie că atacă dubbele legături ale citozinei din poziția 4 și 5, (rezultând o nucleotidă ce suferă tranziție tautomeră spre forma *oximă* care se poate împerechea cu adenina). Rezultă un efect de tranziție unidirecțională mutagenică $\text{GC} \rightarrow \text{AT}$.

Agenții alchilanți. Acțiunea acestor mutageni se realizează prin introducerea de grupări alchil (metil, etil etc.) în nucleotide. Asemenea efect au substanțe precum epoxizii, dimetilsulfat, dietilsulfat, etilmetansulfonat, metilmetansulfonat (EMS și MMS) ca și nitrosoguanidina (NTG). Unii dintre agenții alchilanți precum EMS și NG alchilează *grupele keto* din poziția 6 de la T și G determinându-le să efectueze tranziții tautomere și astfel condiționând tranziția $\text{AT} \rightarrow \text{GC}$. Alți agenți alchilanți determină alchilarea în alte poziții astfel că bazele nu mai pot fi recunoscute de ADN polimerază ca și în cazul dimerilor timinici. Asemenea baze cu alterări structurale sînt supuse procesului reparator. Când acest proces reparator nu reușește îndepărtarea leziunilor apar atît tranziții cît și transversii (tabelul 13).

Efectul agenților alchilanți se aseamănă în multe aspecte cu acela al radiațiilor ionizante din care cauză agenții alchilanți au mai fost numiți substanțe radiomimetice.

Efectele unor mutageni asupra bazelor azotate:

Mutagenul	Baza inițială (normală)	Baza modificată	Cu cine se împerechează	Schimbarea produsă
ACIDUL AZOTOS (NITROS) (HNO_2)	CITIZINA	URACIL	ADENINA	GC→AT
	ADENINA	HIPOXANTINA	CITIZINA	AT→GC
HIDROXILAMINA	CITIZINA	TAUTOMERIE	ADENINA	CG→AT
ETILMETAN-SULFONAT (EMS)	TIMINA	TIMINA modificată	GUANINA	AT→GC
	GUANINA	GUANINA modificată	TIMINA	GC→AT

Cele mai multe efecte ale mutagenilor chimici nu pot fi însă inactivate. Polimeraza nu poate fi activă în prezența unor baze modificate chimic, neputând condiționa împerecherea exactă de baze. Se desfășoară un ciclu abortiv de replicare.

Acidul nitros precum și agenții alchilanți determină uneori unirea celor două catene ale dublului helix prin așa-numitele *legături încrucișate (crosslinking)* ceea ce face ca cele două catene să nu se poată separa în timpul replicării spre a funcționa ca matriță.

Antibioticele. Dintre antibioticele care prezintă efect mutagen se citează *mitomicina*, *actinomicina D*, *echinomicina* etc. Aceste substanțe interferă cu structura ADN sau cu aparatul enzimatic al replicării și transcrierii, manifestându-se ca agenți mutageni.

Acridinele. Cea mai folosită acridină în scopul inducerii mutațiilor este proflavina. Mutațiile induse de către acridine nu sînt reversibile cu analogi sau hidroxilamină. Efectul acridinelor este reprezentat de aditii și deleții de baze azotate, efect înregistrat uneori și în cazul iradierii UV sau în cazul mutațiilor spontane.

2.3. AGENȚI MUTAGENI BIOLOGICI

Din această categorie fac parte virusurile și micoplasmele, care pot acționa direct asupra materialului genetic. Dealtfel, virusurile sînt paraziți absoluți de nivel genetic, determinînd alterări în expresia genică, modificări structurale reprezentate la celulele eucariote prin pulverizări cromozomale generalizate, fragmentări cromozomale, translocatii etc. Virusurile condiționează de asemenea transformarea malignă a celulelor, aneuploidii, poliploidii etc. Virusul SV 40 determină în culturi de celule umane creșterea frecvenței aberațiilor cromozomale (pierderi de cromozomi, rupturi de cromozomi, apariția de cromozomi dicentrici și inelari și numeroase tipuri de translocatii).^{*} Virusul rubeolei provoacă la persoanele bolnave o incidență mare de rupturi cromozomale în leucocite.

Sînt și cazuri în care substanțe excretate în mediu (exocrine) de către unele organisme, cum ar fi algele albastre, au efect mutagen, determinînd bunăoară aberații cromozomale la ceapă (Gavrila, 1978).

3. TIPURI DE MUTAȚII

3.1. MUTAȚIA GENICĂ

Mutația genică numită uneori și mutație punctiformă, afectează structura și funcția unei gene și este reprezentată de schimbări în secvența normală de nucleotide ce corespunde unei gene, realizate în special prin substituiri de baze de tip *tranziție* și *transversie*, prin *inserții* (adiții), *deleții*, *inversii* sau *transpoziții* — mutări de nucleotide în poziții noi cu sau fără inserție.

Schimbări în secvența de baze a ADN apar prin greșeli de incorporare care au loc în timpul unei runde de replicare și prin greșeli de împerechere, care urmează greșelilor de incorporare și care se realizează în timpul replicărilor ulterioare. Asemenea schimbări au loc în urma acțiunii agenților muta-

^{*} Cromozomul SV₄₀ se integrează la cîteva situri (dintre care cel puțin unul este localizat în cromozomul 7.) fiind transcris într-un ARNm gigant, specific lui SV₄₀. Integrarea genomului viral se face prin intervenția unor enzime specifice (integraze) iar excizia sa sub acțiunea altora (excizionaze).

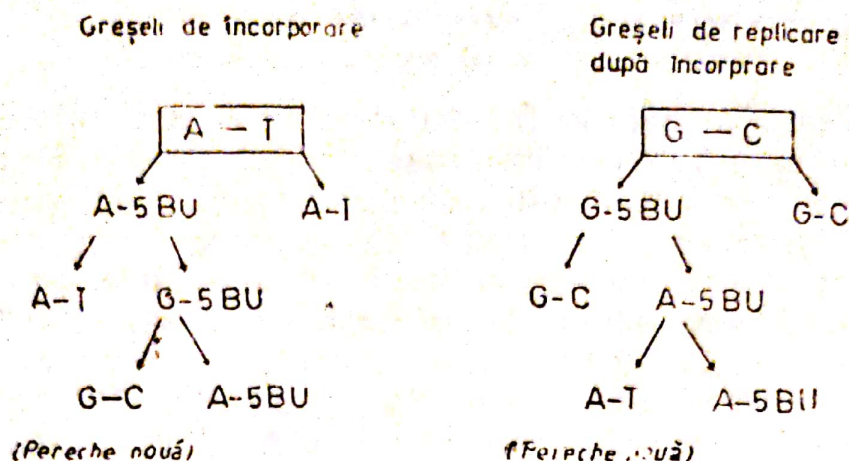


Fig. 78. Tranzițiile purină-purină ($A \rightarrow G$, $G \rightarrow A$) sub acțiunea 5 — bromouracilului aflat în diferitele sale forme tautomere.

geni. Astfel, forma tautomeră obișnuită a 5BU fiind starea *keto*, asemănătoare timinei, se încorporează în catena nouă ca fiind complementară adeninei. Forma tautomeră rară enolică a 5BU se poate împerechea cu G așa cum face forma enolică a lui T și formează perechea 5BU—G. Apar deci erori de incorporare care determină formarea unor perechi anormale de baze azotate de tip A—5BU și G—5BU. Partenerul 5BU din perechea A—5BU continuă să specifice A și nu are loc eroare de replicare. În forma sa enolică 5BU se împerechează cu G, atunci A inițial va fi înlocuit cu G printr-o tranziție ($A \rightarrow G$) care apare drept consecință a unei erori de replicare. Cum 5BU din perechea G—5BU este în mod normal în forma *keto*, la următoarea rundă de replicare, se va împerechea cu A. Pe această cale are loc tranziția $G \rightarrow A$. Rezultă că 5BU determină, în urma unei greșeli de incorporare, tranziții purină-purină în ambele direcții (Fig. 78). Modificările de nucleotide apar de asemenea prin ruperea coloanei glucido-fosforice a ADN la nivelul a 1, 2 sau mai multe poziții, urmată de rearanjamente de fragmente moleculare. Pe această cale pot apare modificări precum deleții, inversii, transpoziții etc.

Formele tautomere ale bazelor azotate rezultă în urma unei noi distribuții de electroni și protoni cu rearanjări în distribuția atomilor de hidrogen în molecula acestora. În forma sa tautomeră rară, baza azotată nu se poate împerechea cu partenerul său normal, complementar. Astfel, A în forma sa tautomeră (A^*) nu se împerechează cu timina ci cu citozina nor-

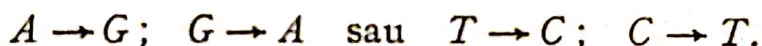
mală (C). Tot astfel apar perechi anormale G—T; T—G și C—A (Fig. 79).

Încă din 1953, Watson și Crick au admis că apariția bazelor azotate în forma lor rară poate reprezenta cauza mutației în timpul replicării ADN. În prima rundă de replicare, adenina tautomeră (A^*) plasată într-o catenă veche se va împerechea cu C normală. În a doua rundă de replicare A^* poate reveni la starea sa normală, dar în catena complementară în locul T a fost introdusă C. Acesta se va împerechea cu G. Astfel vor lua naștere două tipuri de molecule ADN, unul identic cu molecula parentală, altul mutant în care perechea A—T a fost înlocuită cu perechea G—C. Aceasta reprezintă o dublă tranziție purină-purină și pirimidină-pirimidină. Cele două molecule diferite de ADN pot fi separate în celule diferite rezultând o clonă normală și o clonă mutantă. În celula în care va fi molecula de ADN în care A—T a fost înlocuit cu G—C va apare o mutație. Asemenea mutații ce apar în timpul replicării ADN se numesc mutații prin *erori de copiere* (Fig. 80).

3.1.1. TRANZIȚIA

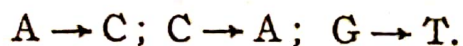
Duce la înlocuirea unei baze purinice cu o bază purinică sau a unei baze pirimidinice cu o bază pirimidinică, la nivelul unor situri din catena polinucleotidică de ADN

Prin tranziție au loc următoarele schimbări:



3.1.2. TRANSVERSIA

Duce la înlocuirea unei baze purinice cu o bază pirimidinică sau a unei baze pirimidinice cu o bază purinică de tipul:



Asemenea modificări pot fi reprezentate după schema generală din figura 81.

Existența transversiiilor a fost postulată încă din anul 1959 de către E. Freese, dar dovezile asupra lor sînt numai indirecte și vin din analiza secvenței de aminoacizi a hemoglobinei normale (A) și hemoglobinei anormale (S). Experimental s-a do-

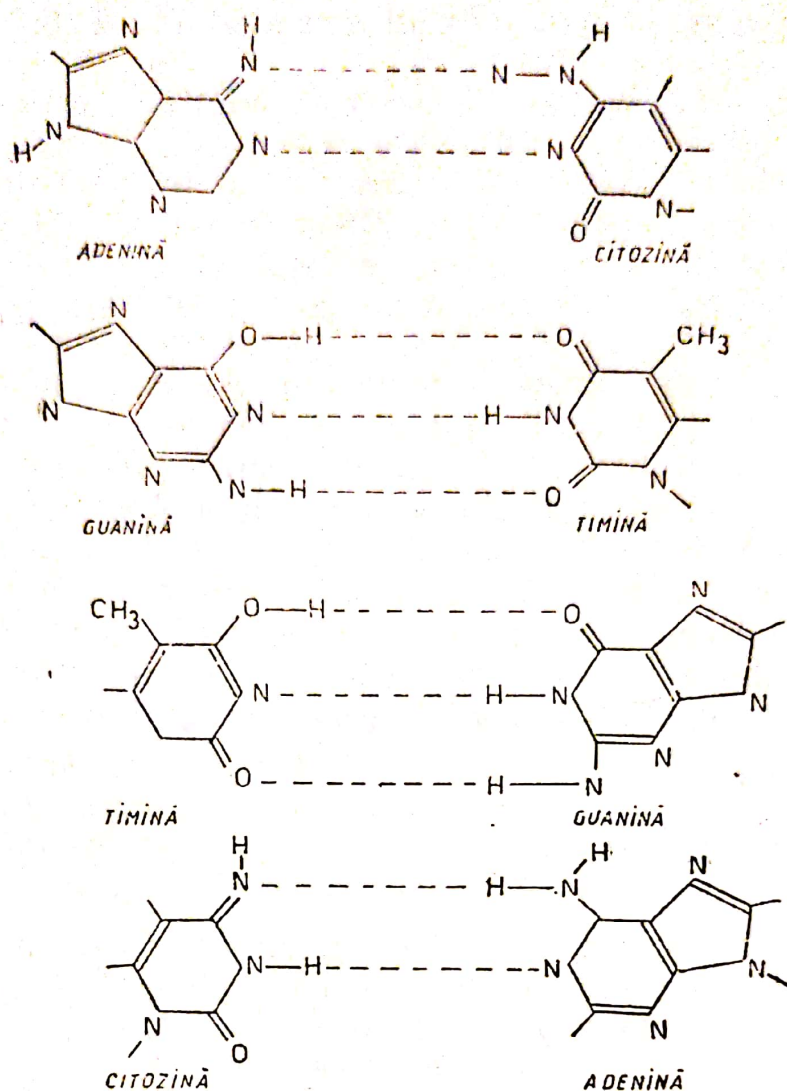


Fig. 79. Imperecherile anormale de baze azotate realizate de formele lor tautomere.

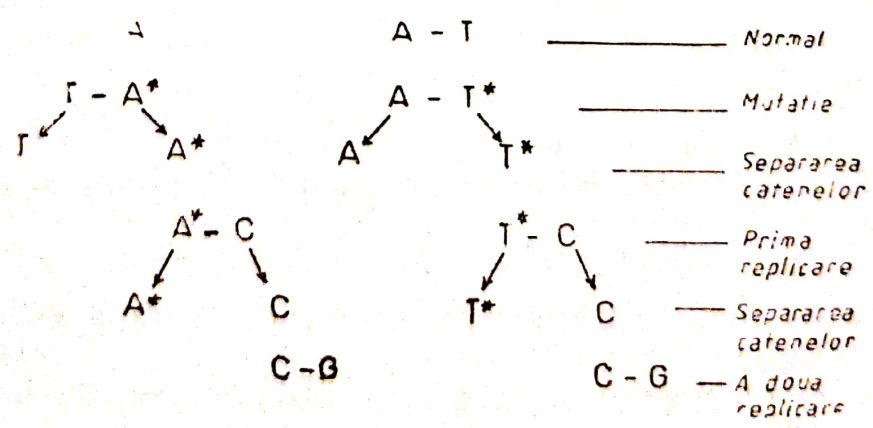


Fig. 80. Secvența proceselor care conduc la tranziție (A→G) și transversie (T→G) în urma schimbărilor tautomere în A și T.

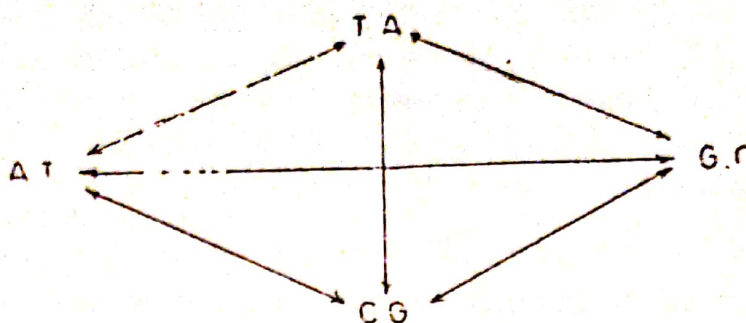


Fig. 81. Schema generală a tranzițiilor și transversiilor.

vedit că în urma tratamentelor cu agenți alchilanți (etilmetan-sulfonat) sau tratamentelor combinate acizi-încălzire are loc depurinizarea ADN. În macromolecula ADN apar astfel goluri și în timpul replicării în aceste goluri pot să intre oricare dintre bazele azotate, realizându-se fie tranziții, fie transversii.

Atât prin tranziție cât și prin transversie se modifică cadrul de citire a mesajului genetic, respectiv are loc modificarea tuturor codonilor din ARN mesager, începând de la codonul care conține mutația, apărând un nou set de codoni care specifică o cu totul altă secvență de aminoacizi. Se creează de asemenea noi codoni nonsens, ștergându-se semnalele normale de terminare a catenei polipeptidice, făcând ca traducerea să se continue în spațiul dintre gene.

3.1.3. ADIȚIA, DELEȚIA ȘI REVERSIA

Mutațiile de aditie și de deleție apar în urma inserției respectiv eliminării unui număr diferit de baze azotate din secvența de nucleotide a genei, ceea ce determină schimbarea cadrului de citire mai ales când are loc aditie sau deleție a uneia, a două, a patru sau a 5 nucleotide. Deleția a trei sau a 6 nucleotide nu modifică decât local cadrul de citire, datorită codificării bazate pe triplete.

Schimbarea cadrului de citire (frameshift mutation) determină modificarea informației genetice, respectiv a mesajului genetic nu însă și a codului genetic ca atare. La nivelul mutantului vor funcționa aceleași principii de codificare ale codului cu triplete, numai că, prin mutație, se vor schimba codonii, rezultând probabilistic codoni de același sens, codoni de sens greșit și codoni nonsens.

Schimbarea de baze din ADN este reflectată în schimbarea de baze din ARNm care, la rândul său va condiționa o secvență alterată de aminoacizi în proteină.

Astfel, la fagul T_4 , în proteina lizozimului apare următoarea secvență de aminoacizi la tipul sălbatic:

-Lis-Ser-Pro-Ser-Leu-Asn-Ala-

pe când la mutanta indusă cu acridin orange secvența este:

-Lis-Val-His-His-Leu-Met-Ala-

Pentru a explica această diferență s-a admis următoarea desfășurare probabilă a evenimentelor mutaționale: deleția lui A în stînga catenei și adiția lui G în dreapta catenei (Fig. 82).

Deleția a schimbat cadrul de citire al mesajului genetic și cum ARNm este citit secvențial, codon după codon, de la stînga la dreapta, noile aranjamente de triplete apărute în urma deleției specifică alți aminoacizi. Adiția lui G însă restabilește, dincolo de punctul de adiție, cadrul normal de citire și proteina sintetizată în aceste condiții nu va prezenta decît pe o porțiune restrînsă modificări în secvența sa de aminoacizi, avînd șansa de a funcționa normal.

Talasemia este o maladie ereditară umană care determină o anemie severă. Ea are la bază o deleție de cel puțin 40 000 perechi de nucleotide de la nivelul locusului genei globinei $\gamma \delta \beta$.

Dacă după o mutație progresivă (*forward mutation*) are loc o mutație regresivă (*back mutation*) se realizează așa-numita *reversie* prin care se restaurează ordinea inițială a secvenței de baze azotate de la nivelul genei. Dacă prin mutație regresivă (mutație înapoi) se produce un nou triplet care însă, în virtutea caracterului de degenerare al codului, codifică același aminoacid, sau este greșit citit, deși nu apare o reversie propriu-zisă la nivelul genei, se restabilește ordinea inițială de aminoacizi la nivelul catenei polipeptidice și un asemenea eveniment se numește reversie operațională.

Tipul normal		-AAA-AGU-CCA-UCA-CUU-AAU-GCA-
		Lis - Ser - Pro - Ser - Leu - Asn - Ala
Tipul mutant și	Deleția lui A (↑)	-AAA-GUC-CAU-CAC-UUA-AUG-GCA-
	adiția lui G (↑)	-Lis - Val - His - His - Leu - Met - Ala-

Fig. 82. (Explicația în text).

3.1.4. MUTAȚII DE ACELAȘI SENS (SAME SENSE M.)

O substituție în ce de-a treia bază azotată a unui codon care este redundantă sau sinonimă datorită degenerării codului genetic și oscilării codon-anticodon nu duce în mod obligatoriu la alterarea secvenței de aminoacizi din catena polipeptidică. Acest tip de mutație se numește *mutație în același sens*.

3.1.5. MUTAȚIE DE SENS GREȘIT (MISSENSE M.)

Mutația de sens greșit apare ca urmare a unei substituții de baze care face ca în timpul traducerii genetice a ARNm să aibă loc substituirea unui aminoacid într-o poziție specifică a catenei polipeptidice, rezultând un fenotip mutant, care poate fi mai ușor sau mai greu detectat.

Mutația missense poate fi represată, contracarată printr-o mutație secundară care afectează structura și funcția ARNt care astfel devine ARNt *supresor*. Acesta va putea duce la inserția unui aminoacid corect la situl corespunzător unui codon care a suferit o mutație missense. Dar cum un codon este missense doar într-o anumită poziție, dar de sens normal în oricare altă poziție, înseamnă că moleculele de ARNt supresor determină o traducere greșită generală, făcând ca o asemenea celulă să fie foarte inefficientă în desfășurarea proceselor de metabolism, fiind scena unei supresii nonsens. Incorporarea greșită de aminoacizi în catena polipeptidică (Fig. 83) reprezintă o traducere incorectă a mesajului genetic care apare atât *in vitro* cât și *in vivo*. O oarecare ambiguitate prin care un codon dat poate fi recunoscut de mai mult de un tip de ARNt este probabil o proprietate intrinsecă a procesului de traducere gene-

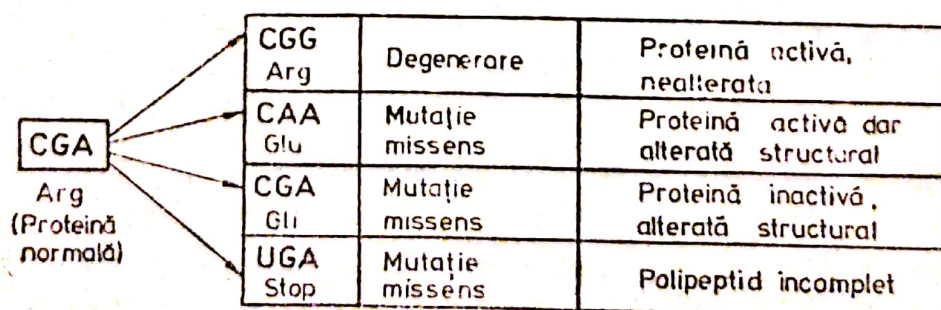


Fig. 83. Raportul dintre degenerarea codului genetic și inducerea mutației în conferirea fenotipului.

tică. Ea se datorește influenței condițiilor de mediu celular din jurul complexului ribozom-ARN m -ARN t , fie a modificărilor în structura ARN t sau ribozomului asupra procesului de recunoaștere codon-anticodon. Nu este exclus ca însăși ARN t -sintetaza să prezinte alterări în specificitatea de recunoaștere atât a aminoacidului cât și a ARN t .

3.1.6. MUTAȚIA NONSENS

Mutația nonsens reprezintă orice substituție de baze sau mutație de schimbare a cadrului de citire (*frameshift mutation*) care convertește un codon sens — ce specifică un anumit aminoacid, într-un codon nonsens (Fig. 84) din ARN m care specifică stoparea, respectiv terminarea catenei polipeptidice (UAA, UAG, sau UGA). Pe această cale are loc o terminare prematură a sintezei catenei polipeptidice la situl la care în ARN m a apărut prin mutație un asemenea codon nonsens.

Bernstein a studiat asemenea mutanți la fagul T4 și a stabilit că ARN t nu poate recunoaște codonul UAG. Cum cuvântul bernstein înseamnă în germană *ambră* (chihlimbar), codonul UAG a fost numit codonul *amber* iar mutantele nonsens, *mutante amber*. Denumirea mai vine și de la ambivalența acestor mutanți care pot crește pe o sușă a gazdei CR63 dar nu pe o sușă B, sușa CR63 supresind caracterul mutant al fagului. Codonul UAA este și el nonsens, nefiind recunoscut de nici un ARN t normal. În mod simbolic a fost numit codon *ocru*. Tot astfel se comportă și codonul UGA. El a fost numit codonul *azur* sau *opal*. O mutație nonsens determină apariția unui asemenea codon în mijlocul mesajului genetic și face ca polipeptida să fie eliberată din ribozom mai înainte ca să se realizeze traducerea întregului mesaj și ca să fie realizat sinteza unei polipeptide complete.

3.1.7. REVERTANȚII MUTAȚIEI NONSENS

Revertanții în general reprezintă organisme care au suferit o mutație, dar al căror fenotip a fost readus la normal în urma unei a doua mutații ce are loc în apropierea punctului, sau chiar în punctul, în care s-a produs prima mutație.

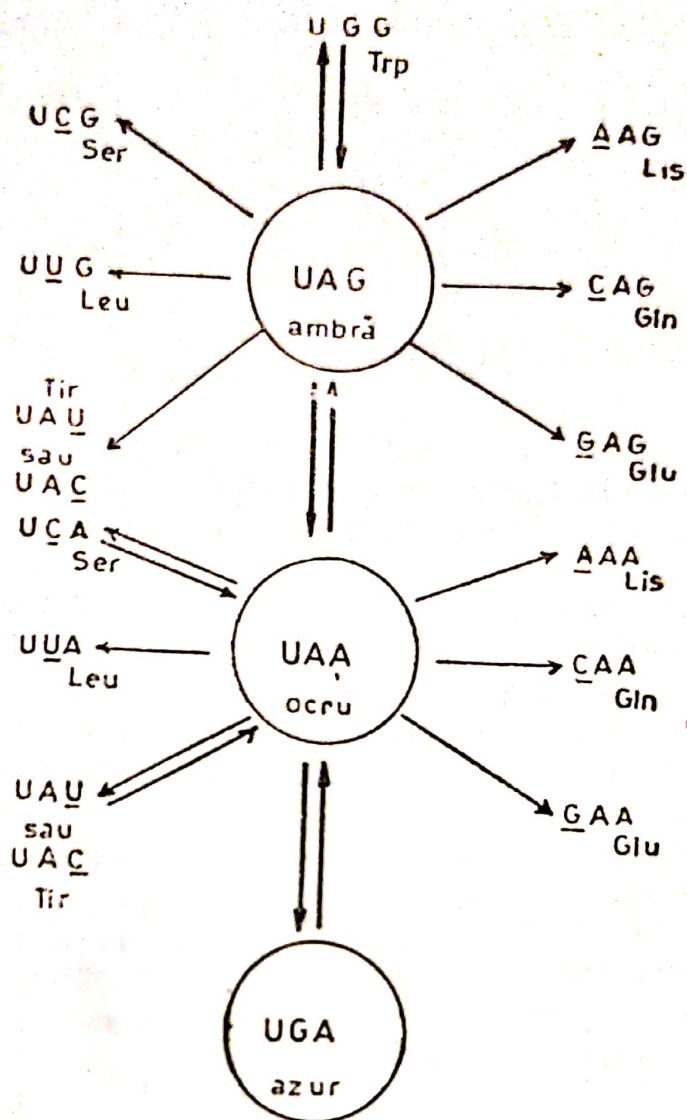


Fig. 84. Codoni nonsens rezultați prin schimbarea unei nucleotide din codonii *sens* și reversile care apar spre codoni *sens* prin modificarea unei a doua nucleotide.

Studiul diferiților revertanți ai mutațiilor nonsens a adus clarificări privind natura codonului triplet, în special al codonilor nonsens (*stop*), de terminare a catenei. La mulți din acești revertanți ai mutației amber a avut loc înlocuirea unui singur aminoacid, adică a avut loc înlocuirea unei singure baze în codonul nonsens.

Prin asemenea mutație punctiformă, dintr-un codon nonsens derivă un codon sens, codificator de aminoacizi.

Printr-un asemenea studiu s-a stabilit că structura codonului amber nu poate fi alta decât UAG. Pe o cale asemănă-

toare s-a stabilit structura celorlalți codoni nonsens UAA și UGA.

În mod normal molecula ARN_t nu poate recunoaște codonii nonsens. Dacă însăși molecula ARN_t este mutantă ea poate recunoaște și codoni nonsens și un asemenea ARN_t se numește ARN_t supresor. Pe această cale poate fi contracarată o mutație nonsens.

3.1.8. MUTAȚIA SUPRESOARE

Efectele unei mutații inițiale pot fi eliminate prin alterarea procesului de traducere. Un astfel de fenomen se numește *supresie*. Dar, tot supresie este și atunci când o mutație care alterează structura unei proteine este urmată de o a doua mutație care anulează efectul primei mutații. Mutația supresoare are același efect ca și reversia sau pseudoreversia. Ea se deosebește însă de acestea din urmă prin aceea că reprezintă rezultatul apariției unei a doua mutații într-o altă regiune a genei față de locul unde s-a produs prima mutație — *supresie intragenică* — sau chiar la nivelul unei alte gene — *supresie intergenică* (fig. 85).

TIPIUL MUTAȚIEI	TRIPLET DIN ADN	CODONUL ARN _m	AMINOACID
REVERSIE ȘI REVERSIE OPERAȚIONALĂ	T C T	→ A G A	Arg
	(A) C T	→ U G A	Trp
	reversie T C T	→ A G A	Arg
	reversie operațională (G) C T	→ C G A	Arg
PSEUDO- REVERSIE	T C T	→ A G A	Arg
	mutație T (G) T	→ A C A	Tre
	pseudoreversie T (T) T	→ A A A	Lis (asemănătoare argininei)
SUPRESIE INTERGENICĂ PRIN SUBSTITUIRI DE BAZE	A G T	→ U C A	Ser
	mutație A (T) T	→ U A A	Nonsens
	A (T) (A)	→ U A U	Tir

Fig. 85. Tipuri de mutații supresoare.

3.1.9. MUTAȚII SILENȚIOASE

Dacă în secvența UUU din ARNm are loc înlocuirea celei de-a treia baze cu C rezultă codonul UUC. Dar o asemenea mutație nu determină nici o modificare în secvența de aminoacizi din catena polipeptidică, deoarece atât UUU cât și UUC specifică același aminoacid — fenilalanina. Astfel, deși au avut loc schimbări în structura ADN, respectiv ARNm, efectul unei asemenea mutații nu se reflectă în structura proteinică. O astfel de mutație poartă numele de *mutație silențioasă*.

3.2. MUTAȚII STRUCTURAL-CROMOZOMALE

Mutațiile structural-cromozomale afectează structura cromozomului determinând așa-numitele aberații sau remanieri cromozomale, dintre care unele pot fi decelate microscopic.

Corespondentul adității din cadrul mutației genice se numește *duplicație*. Ea se exprimă prin creșterea lungimii cromozomului.

Asemenea aberații cromozomale pot fi evidențiate în mod specific folosind metode de bandare a cromozomilor prin care se pun în evidență benzile de heterocromatină. O alterare a modelului de bandare exprimată prin lipsa unei benzi determinate sau prin prezența în dublu exemplar a unei asemenea benzi reprezintă o deficiență sau o duplicație. Dar asemenea aberații cromozomale pot fi evidențiate la diptere analizând microscopic modelul de benzi din cromozomii politeni.

Unele aberații cromozomale modifică cantitatea de material genetic din cromozom. Cu excepția unor soiuri de porumb, organismele superioare homozigote pentru asemenea aberații cromozomale (ambii cromozomi omologi sînt afectați de aceeași mutație) sînt neviabile. Organismele heterozigote pentru deficiență sînt viabile, ceea ce arată că la organismele diploide chiar și prezența în doză simplă a unei gene poate asigura desfășurarea proceselor fundamentale ale vieții. Duplicațiile de regulă nu sînt atât de dăunătoare precum deficiențele iar uneori, în condiții de mare presiune selectivă devin chiar avantajoase. Uneori regiunea duplicată poate suferi mutații adiționale fără să afecteze supraviețuirea speciei sau valoarea adaptativă a genotipului său. Dar deficiențele sînt de regulă dăunătoare.



Fig. 86. Evidențierea unei inversii la nivelul cromozomului politen la un heterozigot prin inversie de *Drosophila pseudobscura* (după Th. Dobzhansky, 1970).

se numește paracentrică. Dar inversia poate avea loc prin rotirea cu 180° a unui segment de cromozom care a rezultat prin fragmentare în două puncte separate, de o parte și de alta a centromerului. În acest caz se poate schimba poziția centromerului și implicit morfologia cromozomului dacă cele două situri de rupere nu sînt — echidistante față de centromer) O astfel de inversie se numește, pericentrică.

Asemenea aberații pot fi decelate atît prin tehnica de bandare a cromozomilor mitotici cît și prin analiza microscopică a cromozomilor politeni la nivelul cărora apar bucle caracteristice datorită imposibilității împerecherii în regiunile afectate de inversie și în care, prin orientare inversă genele devin neomoloage (Fig. 86).

În unele populații naturale, inversiile apar cu frecvență mare din care cauză se consideră că în unele cazuri ele conferă chiar avantaje selective.

Cromozomul *Philadelphia* la om este cromozomul 22 cu o deficiență. El se întîlnește frecvent în cazurile de leucemie. De asemenea o deficiență în brațul scurt al cromozomului 5 uman condiționează manifestarea sindromului „cri du chat” care se manifestă din copilărie prin voce de pisică și întîrziere mintală.

Inversile. Prin inversie se schimbă ordinea genelor în cromozom dar nu este afectată cantitatea totală de material genetic. Cînd o porțiune din cromozom este ruptă și după ce suferă o rotație de 180° se realipește, un asemenea cromozom prezintă o inversie. Inversia se poate produce pe un braț al cromozomului care nu include centromerul și în acest caz nu este afectată nici morfologia cromozomului. Acest tip de inversie

Translocațiile. Translocația reprezintă asocierea fizică a unui fragment de cromozom cu un cromozom neomolog. Translocațiile sînt nereciproce (fragmentul de cromozom 22 trece pe cromozomul 9 în cazul cromozomului *Philadelphia*) sau reciproce. Ceea ce deosebește o translocație reciprocă de schimbul reciproc de fragmente de cromozomi realizat prin crossing-over este faptul că în cazul translocației reciproce schimbul, deși reciproc, poate fi neechivalent, dar mai ales el este realizat între cromozomi neomologi, pe cînd în crossing-over el se realizează între cromozomi omologi și este, de regulă, echivalent.

3.3. MUTAȚII NUMERIC CROMOZOMALE

Asemenea mutații afectează numărul de cromozomi. Astfel poate avea loc o variație a întregii garnituri de cromozomi sau numai a unora din perechile de cromozomi ai complementului cromozomal. Numărul normal de cromozomi care constituie garnitura diploidă de cromozomi este alcătuit din două seturi de cromozomi, unul de origine paternă, altul de origine maternă. Numărul de cromozomi ce corespunde unui set de cromozomi la organisme diploide tipice corespunde cu numărul gametic de cromozomi. El s-a notat cu X și se mai numește număr de bază de cromozomi. Speciile $2n$ au 2 numere de bază de cromozomi adică $2X$. În cazurile de eupoliploidie are loc multiplicarea numărului de bază de cromozomi. Astfel organismele pot deveni $3X = \text{triploide}$; $4X = \text{tetraploide}$; $5X = \text{pentaploide}$; $6X = \text{hexaploide}$ etc. Poate avea loc și o reducere a întregii garnituri de cromozomi și atunci organismele devin haploide (X). Cazul cel mai cunoscut este al trîntorului de albină care rezultînd din ovule nefecundate are o garnitură somatică de cromozomi redusă la jumătate față de lucrătoare sau matcă.

Poliploizii sînt adesea sterili dată fiind posibilitatea asocierilor de multivalenți (existînd cîte 3, 4, 5 etc. cromozomi omologi pentru fiecare grupă individuală neomoloagă de cromozomi din complementul de bază) care condiționează o repartizare neechilibrată a cromozomilor în gameți. Aceștia vor fi neferili sau neviabili în cea mai mare parte.

Poliploidia poate apare în urma nondisjuncției cromozomilor în meioză. Iau naștere gameți $2n$ din a căror unire cu gameți normali n dau organisme triploide ($3X$). Din unirea a doi ga-

meți $2n$ rezultă organisme tetraploide etc. Dacă un ovul este fecundat de mai mulți spermatozoizi poate rezulta un embrion poliploid. Poliploidia poate rezulta prin multiplicarea propriei garnituri de cromozomi — autopoliploidie, sau prin însumarea garniturilor de cromozomi a două specii ce se încrucișează — alopoliploidie. Când un organism hibrid are un complement cromozomal poliploid rezultat din însumarea garniturilor diploide ale speciilor genitoare acel organism se numește *amfiploid*.*

Autopoliploidia apare în natură în urma șocurilor termice, în regiunile în care se înregistrează o variație bruscă de temperatură de la un anotimp la altul, sau de la zi la noapte. Șocurile termice fragmentează fusul de diviziune și cromozomii nu mai migrează spre poli, în două celule fiice. Același efect îl are colchicina. Acțiunea sa de blocare a formării fusului de diviziune se numește *acțiune statmochinetică*. În urma acțiunii colchicinei, nefiind afectată clivarea cromozomilor, rezultă un număr dublu de cromozomi care rămânând în același nucleu se constituie un nucleu de restituție care este desigur poliploid.

Aneuploidie. Variația pozitivă sau negativă nu a întregii garnituri de cromozomi ci a unuia sau ambilor cromozomi omologi dintr-una sau din mai multe perechi de cromozomi se numește *aneuploidie*. Ea afectează atât perechile de cromozomi autozomi cât și heterozomi. Lipsa unui cromozom dintr-o pereche de cromozomi a complementului diploid este desemnată ca $2n-1$ și se numește monosomie. Ea poate afecta simultan 2 perechi de cromozomi și se numește dublu monosomie ($2n-1-1$) sau chiar mai multe perechi de cromozomi, dar de regulă monosomia afectează pe rând perechile de cromozomi. Astfel, la grâu se cunosc 21 de linii monosomice, corespunzând celor 21 perechi de cromozomi. Prezența unui cromozom suplimentar într-o pereche desemnată cu formula $2n + 1$ se numește *trisomie*. La om, trisomia perechii 21 de autozomi condiționează genetic sindromul Down iar trisomia cromozomilor X (XXX)

* În toate cazurile de eupoliploidie ca și în aneuploidie multiplicarea garniturii de cromozomi în primul caz, sau variația numerică a cromozomilor în cel de al doilea, sînt însoțite de o variație corespunzătoare a cantității de ADN. În cazul pseudopoliploidiei ca și al pseudoaneploidiei are loc multiplicarea, respectiv variația numărului de cromozom, fără ca acestea să fie însoțite de o variație corespunzătoare a cantității de ADN. Acestea se realizează prin mecanisme robertsoniene de fisiune și fuziune centrică. Specii cu număr diferit de cromozomi. Dar nu același număr fundamental de brațe cromozomale (NF) sînt foarte înrudite, provenind unele din altele prin mecanisme robertsoniene de fisiune-fuziune centrică și alcătuiesc așa-numitele serii robertsoniene (*Drosophila virilis*, *D. mexicana*, *D. texana* etc.)

condiționează sindromul de superfemelă. Trisomiile apar prin nondisjuncția cromozomilor autozomi sau heterozomi, împerecheați în meioză.

Nondisjuncția meiotică duce la naștere de gameți aneuploizi. Aneuploidia poate lua naștere și prin pierderea de cromozomi — cazul *ginandromorfismului* la drosofilă. Lipsa unei întregi perechi de cromozomi care apare tot în urma nondisjuncției meiotice (celulele reproducătoare care nu primesc cromozomul unei perechi de cromozomi) este desemnată $2n-2$ și se numește *nulisomie*.

Prezența a 2 cromozomi suplimentari într-o pereche de cromozomi — $2n + 2$ — se numește *tetrasomie*.

Prin încrucișări dirijate se pot obține forme combinate nuli-tetrasomice, trisomice-monosomice, care constituie un excelent material privind studiul localizării de gene pe cromozomi.

Avorturile spontane la om au la bază în cea mai mare parte cazuri de aneuploidie, cel mai frecvent fiind întâlnite trisomici și monosomici.

Aneuploizii monosomici prezintă o neviabilitate mare fiind vorba de o deficiență apreciabilă de gene care este letală chiar în condiție heterozigotă. Trisomia ca și duplicația are efecte mai puțin nocive.

La om se nasc adesea embrioni viabili cu trisomii în perechile 8, 13, 18, 21, Y sau X, perechi care conțin blocuri mari de heterocromatină, care fiind de regulă inertă nu afectează apreciabil echilibrul genic. În plus, cromozomul X suplimentar la femelă sau masculul mamiferelor suferă compensația de doză.

Nondisjuncția, mai ales a perechilor 21 din complementul cromozomal uman este condiționată de vîrstă. Ea este mai frecventă la femeile ce au peste 35 de ani. Condiția specială de dictioten a ovocitei umane face să se acumuleze efectele nocive ale factorilor de mediu pe o perioadă lungă de timp afectînd disjuncția cromozomilor în ovogeneză.

La unii bărbați s-a descris și trisomia cromozomilor de sex XXY (sindrom Klinefelter) ca și trisomia XYY. Aceștia din urmă sînt de regulă înalți și manifestă uneori tendințe antisociale.

4. MUTAȚIA ȘI FUNCȚIA PROTEINELOR

Înlocuirea unui aminoacid cu unul similar poate să nu afecteze funcția proteinei. Dacă aminoacidul substituit se află în regiuni neesențiale ale proteinei sau enzimei efectul său

poate fi neglijabil. Dacă înlocuirea de aminoacizi implică părți esențiale ale proteinei, ea poate avea efecte severe, uneori letale.

Hemoglobina umană prezintă două catene α și 2 catene β . Catena β a hemoglobinei normale (HbA) prezintă următoarea secvență N-terminală: val-his-leu-tre-pro-glu-glu-lis... Catena β a hemoglobinei mutante S, de la indivizii homozigoți (mutația afectează ambii cromozomi omologi) prezintă o secvență N terminală în care a avut loc o singură substituție (*glu* $\rightarrow$ *val*) de aminoacizi: *val-his-leu-tre-pro-val-glu-lis*.

Substituirea grupului R încărcat al acidului glutamic cu grupul neutru R al valinei alterează solubilitatea peptidei la tensiuni scăzute de oxigen. Aceasta condiționează, la concentrații scăzute de oxigen trecerea eritrocitului de la forma normală de disc la forma de seceră datorită formării unor cristale de hemoglobină S care deformează eritrocitul. Asemenea celule eritrocitare deformate caracterizează maladia gravă cunoscută ca anemie falciformă (*sickle-cell anemia*) care în condiție homozigotă (S/S) determină moartea indivizilor umani încă din copilărie. Se cunosc numeroase alte cazuri de hemoglobinopatii umane (Fig. 87) și care au la bază substituția unui singur aminoacid.

Asemenea erori în structura proteinelor și a enzimelor apărute ca urmare a unor erori în structura genei au fost întâlnite încă din 1902 de către medicul englez A. Garrod, pe care le-a descris drept erori înnăscute de metabolism.

Astfel, *alcaptonuria* se datorește unei alterări în structura genei care specifică enzima ce convertește acidul homogentisic în acid acetoacetic. Enzima alterată este nefuncțională. Acidul homogentisic neconvertit în acid acetoacetic este eliminat ca atare în urină. În contact cu aerul acidul homogentisic se înnegrește. Pe această cale — înnegrirea urinei prin expunere la aer — se depistează maladia. Aceasta apare cu o frecvență de 1 la 10^6 și se manifestă clinic în condiție homozigotă prin tulburări artritice.

O altă eroare înnăscută de metabolism este *fenilketonuria*. Ea apare la indivizi homozigoți recesivi (*p/p*) și se datorește absenței enzimei fenilalanino-hidrolază. Enzima transformă fenilalanina în tirozină. În absența enzimei se acumulează fenilalanina care este convertită în acid fenilpiruvic. Acesta este dăunător organismului și determină retardatie mintală precum și pigmentație redusă în păr și piele.

HEMOGLOBINA ANORMALĂ	CATENA AFECTATĂ	POZIȚIA AMINO-ACIDULUI	SUBSTITUȚIA DE AMINOACIZI	SUBSTITUȚIA DE CODONI	MECANISMUL MUTAȚIONAL
HIKARI	β	61	Lis $\rightarrow$ Asn	AAA $\rightarrow$ AAU AAG $\rightarrow$ AAC	Transversie
I	α	16	Lis $\rightarrow$ Glu	AAA $\rightarrow$ GAA AAG $\rightarrow$ GAG	Tranzitie
NORFOLK	α	57	Gli $\rightarrow$ Asp	GGU $\rightarrow$ GAU GGC $\rightarrow$ GAC	Tranzitie
SEATTLE	β	70 sau 76	Ala $\rightarrow$ Glu	GCA $\rightarrow$ GAA GCG $\rightarrow$ GAG	Transversie
M. MILWAUKEE	β	67	Val $\rightarrow$ Glu	GUA $\rightarrow$ GAA GUG $\rightarrow$ GAG	Transversie
M BOSTON	α	58	His $\rightarrow$ Tir	CAU $\rightarrow$ UAU CAC $\rightarrow$ UAC	Tranzitie
HEMOGLOBINA DE CAL	α	24	Fen $\rightarrow$ Tir	UUU $\rightarrow$ UAU UUC $\rightarrow$ UAC	Transversie
HEMOGLOBINA UMANĂ NORMALĂ					

Fig. 87. Hemoglobinopatiile umane și mecanismele genetice de apariție. De asemenea se prezintă calea evoluției printr-o transversie a catenei α a hemoglobinei de cal și a hemoglobinei umane.

Alterări ale genei care dirijează sinteza enzimei fosforiltransferază care intervine în metabolismul purinelor duc la acumulare de acid uric. Aceasta condiționează manifestarea sindromului Lesch-Nyhan ce se manifestă prin grave tulburări de comportament. Sindromul apare la indivizii homozigoți pentru o genă recisivă plasată pe cromozomul X uman.

În toate aceste cazuri terapia presupune administrarea de alimente lipsite de precursori ai produșilor care se acumulează și care sînt dăunători.

5. GENE MUTABILE ȘI PARAMUTABILE

Unele gene se caracterizează printr-o mare frecvență de mutații în diferite direcții manifestând deci un pronunțat grad de instabilitate genetică. Asemenea gene se numesc gene mutabile sau gene instabile. Ele caracterizează îndeosebi celulele somatice la plante și condiționează variațiuni în culoarea frunzelor și petalelor, care apar cel mai adesea peștiște. De exemplu, pe cromozomul 3 de la porumb s-a pus în evidență prezența unei gene a_1 . Alela sa dominantă A_1 condiționează prezența antocianului în frunze, mătase, glume, antere și stratul aleuronic. Această genă este o genă mutabilă.

Tot o genă mutabilă, descrisă la porumb este și gena P . Ea condiționează culoarea pericarpului. Expresia sa fenotipică cade sub incidența controlului unui factor genetic „modulator” care în doză simplă sau dublă inhibă dezvoltarea culorii în pericarp.

La procariote frecvența mutațiilor punctiforme este reglată de mutageni și antimutageni codificați de gene ca și de polimeraze mutatoare și antimutatoare. ADN polimeraza însăși permite o oarecare variabilitate genetică acționând ca agent mutagen intern. O genă mutatoare la *E.coli*, desemnată *mut T*, determină în mod preferențial transversii $AT \rightarrow CG$. Această genă determină mutații în cele mai multe gene sau chiar la toate genele la o rată care este de 10 pînă la 100 ori mai mare decît rata mutației la tipul sălbatic. Produsul genei *mut T* pare a fi implicat în replicarea ADN, interacționînd cu gena *dna E* care codifică ADN polimeraza III. S-au mai descris și gena *mut S* care determină schimbări de perechi de baze și gena *mut D* care determină adiții sau deleții mai mari sau mai mici de baze azotate. Rata mutației la diferite specii este genetic reglată (probabil prin supresie) astfel că celulele vor avea același număr de mutații (cele mai multe fiind dăunătoare) în ciuda diferențelor în dimensiunea genomului.

6. PARAMUTAȚIA

Fenomenul de paramutație a fost descris la porumb atunci cînd s-a analizat gena R care condiționează colorarea aleuronei.

Paramutabilitatea reprezintă capacitatea unei gene (genă paramutabilă) de a suferi o modificare ereditară direcționată,

care afectează expresia genică și care se manifestă sub influența unui agent dat care s-a numit agent paramutagenic. Mai exact paramutația desemnează orice alterare direcționată a expresiei unei gene paramutabile în urma unei asocieri cu o altă alelă paramutagenă. Fenomenul poartă și numele de conversie somatică sau *ereditate de tip conversie*. Paramutația reprezintă în esență un tip de instabilitate genică datorată heterocromatinizării în locusul sau în apropierea locusului la care apare repressia metastabilă a activității genice.

Paramutația reprezintă o schimbare pentru mai multe generații în expresia unei gene numită genă paramutabilă (gena R' de pe cromozomul 10 de porumb care determină sinteza pigmentului antocianic în aleuronă și unele părți vegetative ale plantei) sub acțiunea unei gene paramutagenice (gena $R^{s'}$ de la porumb). Genele paramutagenice sînt implicate în scăderea capacității de acțiune a alelei lor paramutabile.

II. RECOMBINARE GENETICĂ

1. GENERALITĂȚI PRIVIND RECOMBINAREA

Dacă mutația determină apariția noului în ereditate modificînd structura și funcția materialului ereditar cu apariția de noi gene respectiv de noi caractere fenotipice, recombinația genetică reprezintă un proces complex prin care se realizează noi aranjamente ale unor gene preexistente. Prin recombinație genetică se realizează noi relații de înlănțuire dintre gene sau unități de recombinație de gene, care au fost numite de către Benzer, în 1957, *reconi*.* În urma recombinației genetice nu re-

* Cercetările lui S. Benzer (1955—1957), efectuate pe mutanți de fag T_4 cu aplicarea testului de complementație cis-trans au stabilit că mutantul m_1 (avînd afectată subregiunea rIIA) și mutantul m_2 (avînd afectată subregiunea rIIB) nu pot infecta tulpina $K_{12}\lambda$ de *E. coli*, dar pot infecta tulpina B a bacteriei. Dacă însă se face o infecție simultană a tulpinei B de *E. coli* cu cei doi mutanți fagici, rezultă descendenți fagici care pot infecta de asemenea tulpina $K_{12}\lambda$. Explicația dată de Benzer pentru acest interesant fenomen a fost următoarea: regiunea rII este un locus genic complex care funcționează ca unitate de funcție (CISTRON) și al cărui produs de transcriere dirijează la tipul normal de fag sinteza unui produs proteinic prin care fagul poate infecta orice tulpină de

zultă alterări în structura și funcția cromozomilor ci rezultă cromozomi (genofori) normali dar care poartă gene derivate de la diferiți genitori.

Recombinarea genetică duce la nașterea de indivizi recombinanți, celule recombinante sau molecule recombinante și se realizează în meioză — recombinație meiotică, în mitoză — recombinație mitotică sau recombinația facilitată de diferitele mecanisme de transfer de gene de la bacterii (conjugare, transformare, transducție, F-ducție, lizogenizare) sau în timpul multiplicării virusurilor. Recombinarea este un fenomen foarte frecvent ceea ce este o dovadă a avantajului pe care îl oferă speciilor. El stă la baza diversității indivizilor unei populații date. Această diversitate permite la rândul său o mai mare flexibilitate, făcând ca schimbările nefavorabile de mediu să nu afecteze întreaga populație sau specie, pentru că anumiți indivizi cu caractere recombinate se dovedesc a face față cu mai multă eficiență unor asemenea influențe nefavorabile de mediu. Recombinarea, ca de altfel și mutația, stau la baza variabilității genotipice a speciilor, oferind material inițial pe care lucrează selecția naturală. Recombinarea lărgeste limitele de adaptare a organismelor.

Ca și mutația, fenomenul recombinării genetice este universal în lumea vie și are în esență la bază formarea unor molecule recombinante de ADN.

Toate sistemele biologice care au ca material ereditar ADN sînt sisteme potențial recombinanționale. Numai la ribovirusuri vegetale nu a fost încă remarcată recombinația genetică, dar

E. coli sensibilă la fag T_4 . Mutanții fagici au afectată această regiune și ei nu pot infecta decît tulpina B de *E. coli*. Cînd cei doi mutanți fagici infectează simultan această tulpină bacteriană între ADN lui M_1 și cel al lui m_2 se realizează recombinația (printr-un proces de rupere-reunire), la nivelul regiunii rII, adică printr-un crossing-over intragenic) în urma căreia subregiunea mutantă rIIA vine în continuitatea subregiunii mutante rIIB, astfel că cele două mutații sînt acum plasate pe o aceeași moleculă de ADN (poziția CIS) (la începutul infecției mixte ele erau pe molecule diferite de ADN (poziția TRANS). Totodată subregiunea normală rIIA vine în urma recombinării intragenice în continuitatea subregiunii normale rIIB, adică tot în poziția CIS, ceea ce duce la nașterea unei molecule recombinate de ADN, cu revenirea la tipul normal de fag, capabil de a determina infecția tulpinei $K_{12}\lambda$ de *E. coli*. Din această experiență s-a dedus că gena funcționează ca unitate (CISTON) în determinarea sintezei unui produs, dar poate prezenta subunități de mutație (MUTONI) și de recombinație (RECONI) a căror dimensiune minimă este perechea de nucleotide. Și la eucariote a fost descris crossing-overul intragenic (locusul genic „apricot” de la drosofilă).

la ribovirusurile animale fenomenul a fost evidențiat. Astfel, la virusul gripal (influenza) există un genom ARN alcătuit din 8 segmente covalent legate, reprezentând gene diferite. În condiție de infecție mixtă între diferitele segmente ale genomului virusului gripal se realizează recombinația. Particulele virale recombinate vor avea unele segmente ale genomului de la o tulpină și altele de la cealaltă tulpină. Noile tulpini virale recombinate vor avea virulențe diferite. Prin recombinația genetică hemaglutinina, antigen de la suprafața virusului — suferă modificări care o face să nu fie anihilată de acțiunea specifică a vechilor anticorpi. Virulența virusului gripal este determinată poligenic iar prin recombinație nu se știe care va fi tulpina virală ce va determina viitoarea epidemie de gripă. Recombinația genetică interloca a fost evidențiată experimental între tulpinile SWE și MEL ale virusului gripal între diferitele tulpini ale virusului poliomeleitei incubate simultan în oul embrionat de găină.

Orice model de recombinație implică două caracteristici esențiale ale procesului, și anume sinapsa care înseamnă alinierea de segmente omoloage de cromozomi, respectiv de molecule de ADN și schimbul, care reprezintă recombinația de substanță, respectiv de informație purtată de părțile omoloage aflate în sinapsă. Ca atare, în toate situațiile, recombinația genetică implică asocierea infimă a întregului material ereditar sau a unei părți din acesta care aparține la cel puțin două genotipuri diferite. Considerată la nivel molecular, recombinația implică participarea a cel puțin două duplexuri ADN cu secvențe de nucleotide similare (omoloage) și care derivă de la aceeași specie de virus, bacterie sau organism eucariot. Ingineria genetică a lărgit într-un anumit fel sfera recombinației, în cadrul ei realizându-se ADN recombinant care provine de la specii diferite — plasmidă bacteriană — gena pentru insulină sau gena pentru hemoglobină sau gena pentru *somatostatina* de la mamifere etc.

Organismele recombinate pot fi deosebite de cele care nu au realizat recombinația genetică prin studii de analiză genetică.

Luând cazul general al unei specii bacteriene bunăoară, admitem că în cadrul ei s-au izolat două tulpini mutante. O tulpină poate crește numai dacă pe mediul minimal se adaugă histidină ceea ce înseamnă că este o mutantă auxotrofă care nu are capacitatea de a sintetiza intracelular histidina. Ea a fost desemnată *his*⁻, fiind prototrofă (*trp*⁺) pentru triptofan.

A doua tulpină este auxotrofă pentru triptofan astfel că nu poate crește pe mediu minimal decât dacă se adaugă triptofanul. Aceasta a fost desemnată trp^- , fiind prototrofă (his^+) pentru histidină.

Dacă cele două tulpini mutante se cultivă împreună pe un același mediu suplimentat cu cei doi aminoacizi și după un anumit timp celulele sînt trecute pe mediu minimal se constată că cele mai multe celule prezintă caracteristicile lor genetice inițiale, cu exprimarea fenotipică a acelorași markeri genetici (auxotrofie pentru histidină sau auxotrofie pentru triptofan). Unele celule însă pot crește pe mediu minimal simplu pe cînd alte celule nu pot crește pe mediu minimal decât dacă la acesta se adaugă atît histidina cît și triptofanul. Aici este vorba de realizarea recombinării genetice în dublu sens: schematic evenimentele recombinatorii pot fi prezentate ca în fig. 88.

Recombinarea genetică s-a realizat între markeri genetici his^+ și trp^+ , respectiv his^- și trp^- . Comparînd comportamentul biochimic al mutantelor inițiale și al recombinanților se poate deduce că duplexurile parentale au suferit un proces de rupere-reunire din care au rezultat două tipuri de organisme recombinante, unul prototrof pentru ambii aminoacizi și deci normal, de tip sălbatic iar altul auxotrof pentru ambii aminoacizi și deci dublu mutant.

Recombinarea genetică presupune deci un schimb de informație genetică, schimb care se realizează cu foarte mare precizie pentru a se preîntîmpina orice pierdere de informație ereditară în cromozomul recombinant. Acesta va trebui să aibă

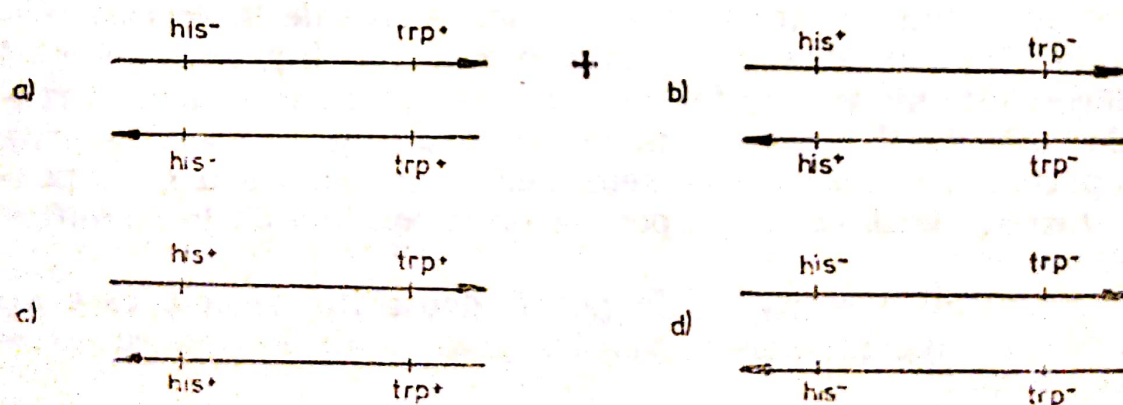


Fig. 88. Schema recombinării genetice judecată după fenotip. (a) — duplex parental ce aparține tipului mutant care este auxotrof pentru histidină; (b) — duplex parental aparținînd auxotrofului pentru triptofan; (c) — duplex recombinant ce aparține tipului normal (rezultat prin recombinare) prototrof pentru histidină și triptofan; (d) — duplex recombinant ce aparține tipului dublu-mutant (rezultat prin recombinare) auxotrof atît pentru histidină cît și pentru triptofan.

aceeași lungime, același număr de nucleotide și același număr de gene, deoarece integritatea structural-funcțională a structurii recombinante este de importanță vitală pentru organism, respectiv specie. Pentru aceasta, evenimentul recombinational va trebui să se desfășoare aproximativ la aceeași poziție fizică a celor doi cromozomi parentali, pentru ca schimbul reciproc de material ereditar să fie echilibrat.

Până acum au fost propuse două modele de bază care explică realizarea schimbului reciproc de material ereditar, respectiv de informație genetică, făcând ca markeri genetici de pe două molecule omoloage să fie aduși pe o singură moleculă de ADN. Primul model, bazat pe teoria lui Janssens elaborată în 1909 și care are ca suport corelația observată dintre chiasmele meiotice și recombinarea genetică (crossing-over). Acest model admite procese fizice de rupere-reunire (*breakage & joining*) a macromoleculelor omoloage de ADN parentale cu formarea de macromolecule recombinante (Fig. 89).

Al doilea model, numit *modelul copierii alternative* sau *alegerii copiei* (*copy choice*) propus de Belling în 1931 admite că informația genetică nu însă și materialul ereditar se recombina. Potrivit acestui model molecula recombinantă este sintetizată în timpul recombinării și conține informație derivată de la ambii părinți. În cadrul acestui model se admite că două molecule de ADN purtând markeri genetici diferiți se asociază și replicarea are loc folosind propria matriță până într-un punct în care catena nou sintetizată schimbă propria matriță spre a folosi o catenă a moleculei omoloage în calitate de matriță. Catenele nou sintetizate sînt astfel recombinante, fără a avea loc un schimb fizic dintre duplexurile inițiale. Acest model nu este susținut de date experimentale, căci la bacteriofagi s-a dovedit că pot apare recombinanți în prezența inhibitorilor sintezei ADN.

Nici unul din aceste modele nu explică cum moleculele omoloage de ADN se împerechează înainte de recombinare, oricare ar fi el, mecanismul de recombinare. Cum împerecherea trebuie să fie foarte precisă, singurul mecanism care ar asigura o asemenea înaltă precizie a împerecherii este împerecherea de baze dintre catenele complementare ale dublelor elice de ADN.

În 1963 Whitehouse a propus modelul *polaronului ADN hibrid* spre a explica corecția heterozigoției acestui ADN care duce la recombinarea intracromozomală. Acest model poate explica atât recombinarea reciprocă — adică crossing-overul — cît și recombinarea nereciprocă — adică conversia.

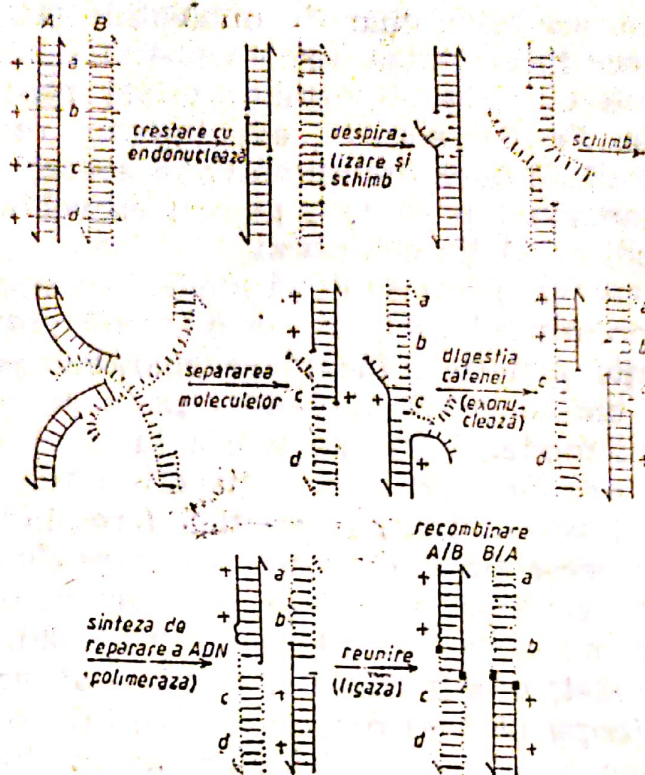


Fig. 89. Mecanismul molecular al recombinării genetice în meioză. Reprezentarea diagramatică a evenimentelor care conduc la recombinarea genetică realizată în stadiile de zigoten târziu și pachiten timpuriu din meioză potrivit modelelor lui Whitehouse, Holliday, Howell și Stern. A și B reprezintă molecule dublu elicoidale de ADN, fiecare aparținând unui cromozom omolog. Împerecherea cromozomilor omologi este urmată de „creșterea” fiecărei molecule de ADN. Aceasta permite despiralizarea și rotirea fiecărui helix ducând la un schimb substitucional al catenelor de aceeași polaritate. În urma acestui schimb rezultă o porțiune scurtă de ADN bicatenar „hibrid” de circa 100 nucleotide lungime alcătuită din câte o catenă complementară de la fiecare părinte. Capetele ADN neîmperecheate sînt digerate de o exonuclează, iar golurile neîmperecheate sînt completate de către o polimerază. Intervine apoi o ligază care unește catenele rupte în catene nucleotidice continui covalent legate. (din Strickberger, 1976).

În cadrul modelului se desfășoară o întreagă secvență de evenimente denumită „ciclul disocierii” în care are loc mai întâi fragmentarea (ruperea) enzimatică a câte uneia din catenele complementare ale celor două molecule de ADN, care se recombina la nivelul unor puncte fixe, aflate în afara sau la capetele genelor, implicate în recombinare.

După rupere are loc despiralizarea și disocierea acestor catene pe o parte sau pe ambele părți ale rupturii. Din punctul de rupere începe apoi sinteza ADN ca un proces de corecție — reparare și se desfășoară într-o direcție sau în ambele direcții. Se sintetizează noi catene polinucleotidice. Apoi se reformează

duble elice prin împerecherea și spiralizarea catenelor complementare, câte una din fiecare moleculă astfel că are loc reunirea fragmentelor și anularea ruperilor.

Considerînd complexe procese replicative reparatorii și de recombinare ne apare imaginea că materialul genetic, cromozomul respectiv macromolecula ADN, se caracterizează printr-o stare dinamică de mare flexibilitate.

În general recombinarea apare ca un schimb de material genetic între doi cromozomi omologi (două molecule de ADN omoloage), secvențele de baze ale celor două molecule angajate în schimb fiind identice pe aproape toată lungimea lor cu excepția a puține situri alelice sau markeri genetici a căror schimbare relevă realizarea schimbului genetic (crossing-overului). Recombinarea mediată de conjugarea bacteriană și realizată între factorul *F* și cromozomul bacterian este o recombinare dintre structuri total neomoloage. Integrarea și excizia plasmidei *F* în, și din cromozomul bacterian nu implică condiția ca cele două structuri să aibă orientare paralelă și în aceeași sens, plasmida *F* putînd fi inserată în cromozomul bacterian fie cu aceeași orientare ca mersul acelor de casornic, fie cu o orientare opusă, la un număr mare de situri generînd o diversitate de tulpini *Hfr* cu diferite puncte de origine și direcții de transfer. Excizia aberantă a plasmidei din cromozomul bacteriei *Hfr* generează o diversitate de plasmide *F'* ce poartă diferite gene bacteriene.

În 1965 Starlinger a descoperit o clasă nouă de mutații *Gal*⁻ de *E.coli* al căror fenotip particular sugera derivarea lor ca rezultat al inserției de secvențe nucleotidice adiționale în secvența normală de nucleotide a uneia din genele *Gal*. ADN extras de la tipul normal de *E.coli* de la asemenea mutații *Gal*⁻ a fost supus denaturării și apoi renaturării amestecului de monocatenene după care s-a realizat cartarea electronomicronică a heteroduplexului format. S-a constatat existența unei bucle de 0,8—1,5 kilobaze reprezentînd o regiune monocatenară în mijlocul heteroduplexului bicatenar ce reprezintă gena *Gal* de la *E.coli*. Această buclă monocatenară apare ca urmare a neomologiei de secvență. Acest tip de secvență adițională s-a numit *secvența de inserție (IS)*. La *E.coli* s-au descris inițial două clase de secvențe de inserție *IS*₋₁ de 0,8 kilobaze lungime și *IS*₋₂ de 1,5 kilobaze lungime.

Ulterior s-a descris a treia clasă *IS*₋₃ avînd tot 1,5 kilobaze lungime. Aceste elemente de inserție au capacitatea de a se implanta în cromozomul bacterian în numeroase situri cu orien-

tare în sensul acelor de ceasornic său inversă. Prin hibridare cantitativă s-a apreciat că în mod normal cromozomul de *E.coli* conține opt copii de IS_{-1} și cinci copii de IS_{-2} distribuite în situri diferite. Aceste secvențe de inserție joacă un anumit rol în inserția plasmidei *F* în cromozomul bacterian. ADN-ul plasmidei *F* din tulpinile *Hfr* este flancat în cromozomul bacterian de la ambele capete de câte un *IS* care aparțin aceleiași clase și au aceeași orientare față de harta cromozomală. Totodată, molecula circulară de ADN a plasmidelor *F* neintegrată conține numeroase copii *IS*.

IS-urile sînt de asemenea prezente în ADN-ul plasmidelor *R* care transportă blocuri de gene de rezistență la antibiotice. Genele de rezistență la antibiotice ale plasmidei *R* inserate în ADN fagic sau ADN bacterian sînt flancate de IS_{-3} . Asemenea gene inserate în cromozom împreună cu elementele *IS* care flanchează formează o unitate numită *transpozon*. Transpozonii cu înalta lor mobilitate genetică stau la baza mării variabilități și plasticități evolutive a bacteriilor. De asemenea, și la eucariote mai ales la porumb au fost descrise de către B. McClintock gene „săritoare” („jumping genes” sau „roving genes”) care stau la baza concepțiilor despre existența unor elemente genetice mișcătoare a căror deplasare se realizează pe calea recombinării.

Multe evenimente recombinazionale cu „specificitate de sit” despre care se credea că nu implică omologia ADN, pot implica scurte secvențe palindromice. Asemenea secvențe sînt implicate și în procesele de duplicație în tandem, deleție, inversie, ca și în crossover din transducție, lizogenie și inducția profagului.

Elemente genetice recombinazionale de genul *IS*-urilor bacteriene sau „genelor săritoare” de la porumb s-au descris și la fagii *T* și λ . Astfel fagul *T₄* are multe gene implicate în recombinare incluzînd și gena proteinei destabilizatoare — adică gena 32.

Procesul de recombinare (crossing over) poate conduce uneori la erori mutaționale. De aceea se constată mai ales la procariote o relație directă dintre genele *mutator* (*mut*) și genele implicate în recombinare (*rec*).

Gena *mutator dam* de *E.coli* face ca celula să prezinte o înaltă capacitate recombinatională.

Un crossover inegal poate genera un mutant, conversia genică putînd fi consecința unui asemenea eveniment.

La eucariote recombinaarea genetică se realizează în special în meioză. Recombinarea genetică intercromozomală este caracteristică doar eucariotelor căci ea implică prezența a mai multor perechi de cromozomi ca și a fusului de diviziune. Recombinarea genetică intercromozomală (disjuncția independentă a perechilor de cromozomi) este însă precedată de recombinaarea genetică intracromozomală realizată prin crossing-over. Aceasta face ca la nivelul bivalentilor din metafaza I a meiozei cromozomii omologi să fie deja recombinanți adică să aibă material genetic atât de origine maternă cât și de origine paternă. Recombinarea genetică intracromozomală este mediată de complexul sinaptonemal, structură tripartită ribonucleoproteinică, necesară dar nu și suficientă pentru realizarea crossing-overului. Totuși implicarea sa în procesul recombinării are la bază constatarea că la femelele de *Drosophila melanogaster* homozigote pentru gena C^3G — genă care supresează crossing-overul genetic nu s-a putut evidenția complexul sineptinomal. Această structură nu a fost evidențiată nici la masculul de drosofilă la care de asemenea în mod normal nu apare crossing-overul.

Din meiocite de *Lilium* și spermatocite de mamifere incluzând omul a fost extrasă o proteină numită *proteină de recombinare* — care are proprietatea de a se atașa preferențial la monocatene de ADN. Această proteină este asemănătoare cu produsul proteinic al genei 32 de la fagul T_4 implicată în recombinaarea la acest fag.

Și la bacterii, în realizarea crossing-overului un rol esențial îl are produsul genei *Rec A*, genă cu efect pleiotropic multiplu (replicarea, repararea, recombinaarea ADN bacterian).

Recombinaarea genetică la toate sistemele biologice implică intervenția unui complex enzimatic de recombinare în care enzimele *endo-* și *exonucleazice* și ADN-*ligazice* joacă un rol primordial, ele fiind implicate în ruperea-reunirea catenelor de ADN ce se recombina. Această activitate de rupere-reunire este însoțită și de o activitate reparatorie care duce la schimbări ale moleculelor de ADN, condiționând crossing-overul genetic. Iau naștere astfel molecule hibride de ADN — heteroduplexuri, fiecare conținând material genetic de la ambii cromozomi omologi, în cantitate egală, recombinaarea fiind deci reciprocă. Schimbările nereciproce condiționează conversia genică.

Recombinaarea genetică intracromozomală este intergenică și intragenică și ea are loc atât la procariote cât și la eucariote. În procesul de crossing-over sînt implicate totdeauna două du-

plexuri ADN, dar în cadrul schimbului participă doar câte o catenă a fiecărui duplex omolog, rupându-se și reunindu-se, celelalte două catene rămânând intacte.

2. CONVERSIA GENICĂ

Termenul de conversie genică a fost introdus de Winkler în 1930 și reluat de Lindegren în 1949. El desemnează o abatere de la raportul de segregare alelică caracteristic organismelor haploide, în speță fungilor și anume o abatere de la raportul $2A : 2a$ dintre produșii haploizi ai meiozei (Fig. 90) sau dacă aceștia suferă o diviziune postmeiotică de tip mitotic, o abatere de la raportul $4A : 4a$. Această abatere rezultă fie în urma unei asimetrii în mecanismul de schimb — *crossing-over asimetric* — sau din reversia unei joncțiuni heteroduplexe de ADN.

La nivel molecular, conversia presupune un transfer de regiuni de ADN lungi de cca 100—200 nucleotide, de la o cromatidă la altă cromatidă, transfer care determină ca anumite regiuni ale cromozomului, inițial hetero-alelice să devină homozigote (homoalelice). Conversia care are loc în timpul meiozei se realizează în două etape. În prima etapă rezultă scurte segmente hibride de ADN la nivelul unor porțiuni corespun-

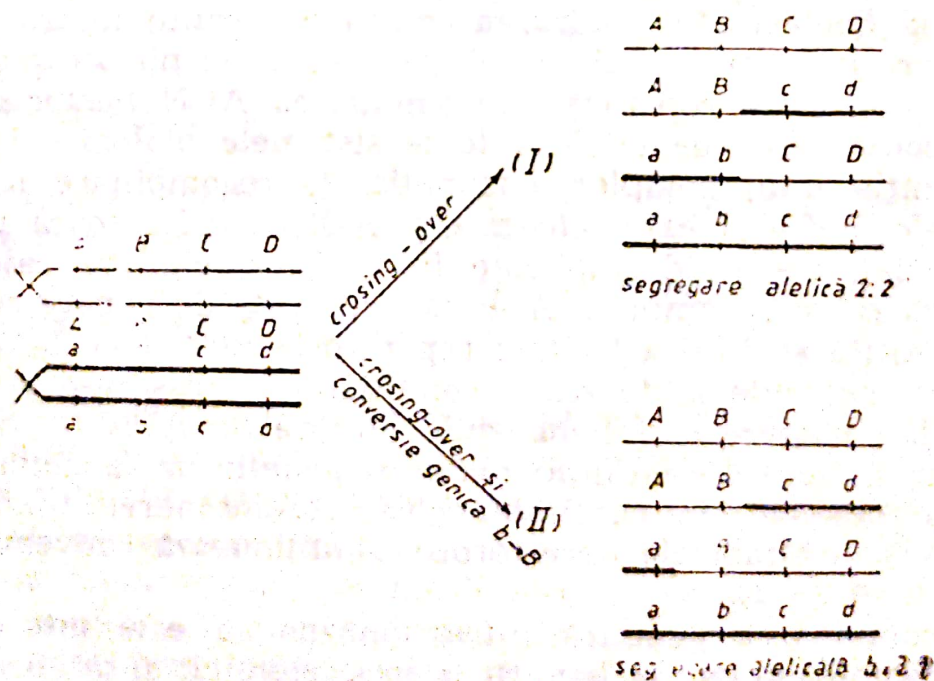


Fig. 90. Recombinarea genetică reciprocă (I) și nereciprocă (II).

zătoare ale celor două cromatide omoloage din profaza meiotică. În a doua etapă intervine un mecanism reparator de tip excizie-reparare numit repararea împerecherilor greșite la nivelul heteroduplexului ADN. Procesul reparator are loc fie în timpul recombinării intergenice prin crossing-over, fie de îndată ce aceasta s-a realizat. Crossing-overul poate duce la leziuni în catenele ce sînt angajate în schimb, astfel că este necesară intervenția unui proces reparator. Conversia prezintă o frecvență mare la nivelul markerilor învecinați cu cei implicați în crossing-over, dar aflați în afara regiunii de schimb.

Schimbări de la heterozigoție la homozigoție se realizează la eucariote prin segregare, prin conversie genică meiotică ca și prin alte mecanisme analoage conversiei genice meiotice care apar în celulele mitotice. Și la fagi a fost remarcată conversia genică prin care apar noi caractere (schimbări în anumite proprietăți antigenice, în producerea de toxine și sensibilitate la infecția cu fagi neînrușiți) la celulele bacteriene ce conțin un profag (conversie lizogenică) sau un fag temperat încă neintegrat în genomul bacterian sau mutante virulente ale fagilor temperați. Cînd fagul este pierdut, celula recapătă caracteristicile inițiale.

Conversia genică reprezintă o cale prin care are loc o abatere de la raporturile normale de segregare mendeliană.

Conversia genică poate fi cel mai ușor evidențiată la ciuperci ascomicete ca și la alte organisme (alga *Chlamydomonas*) la care produșii meiozei dau naștere în mod direct, fără fecundare, la noi organisme haploide. La organismele diploide, ce se reproduc sexuat, produșii meiozei reprezintă gametii. Ei sînt celule extrem de specializate, care nu se mai divid și nu mai pot evolua în afara fecundației prin care dau naștere la zigot. Excepție fac doar unele plante ai căror grăunciori de polen (microspori) dau, prin cultivare pe medii speciale, forme haploide (haploidie prin androgeneză) care reprezintă în același timp forme izogene dar complet diferite unele de altele, dată fiind funcționarea în procesul formării microsporilor a mecanismul segregării și recombinării genetice.

Organismele care își duc cea mai mare parte a vieții sub formă haploidă așa cum sînt ciupercile, prezintă încă un avantaj: produșii meiotici pot fi izolați și cultivați separat, astfel că se poate determina fenotipul și genotipul corespunzător fiecărui din acești produși meiotici. Astfel, la ascomicetele *Sordaria* și *Ascobolus* segregarea după culoarea ascosporilor (negru-galben) este de 4 : 4. Dar în unele asce apare o segregare

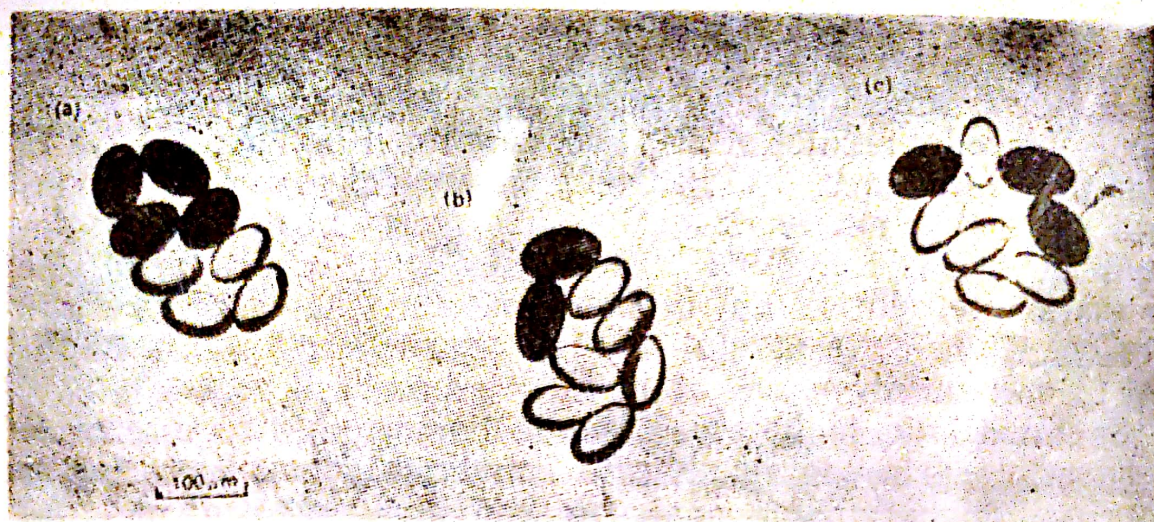


Fig. 91. Conversia genică (după Fincham, 1973).

de 5 ascospori galbeni la 3 ascospori negri sau 6 ascospori de culoare galbenă și 2 ascospori de culoare neagră. Proportțiile pot fi inverse 3 : 5 sau 2 : 6. De asemenea pot apare și raporturi 1 : 7 și 0 : 8 (Fig. 91).

La drojdii, în loc de raportul 2 : 2 apare raportul neobișnuit de 3 : 1 sau 1 la 3 sau 0 : 4 sau 4 : 0. Această modificare a raportului de segregare a produșilor meiotici este urmarea fenomenului de conversie genică în urma căreia o alelă prezentă pe unul dintre cromozomii omologi la începutul meiozei, poate fi convertită unilateral și la frecvențe mult mai mari decât cele care apar prin mutație spontană, în tipul alelic prezent pe celălalt cromozom omolog.

Conversia poate apare în ambele direcții $A \rightarrow a$ și $a \rightarrow A$ cu frecvență egală, așa cum totdeauna se înregistrează la drojdii.

La *Sordaria* și *Ascobolus* conversia $A \rightarrow a$ nu se realizează cu aceeași frecvență cu care se realizează conversia $a \rightarrow A$.

Capitolul X

IMUNOGENETICĂ

„Dreptul de a te apăra este o re-
înnoire a dreptului de a te naște“.

L. Gavrilă*

1. GENERALITĂȚI

Organismul animal prezintă două sisteme de discriminare: sistemul nervos central și sistemul imunitar.

Imunitatea este capacitatea unui organism de a asigura apărarea integrității genetice și a individualității sale față de anumiți factori nocivi de diferite naturi. Fiecare organism este înzestrat cu capacitatea de a face deosebirea între ceea ce îi aparține (*self*) și ceea ce este străin și nu îi aparține (*nonself*). Factorii *self* pot fi reprezentați de componenții proprii, modificați de procesele genetice (mutații) sau chimice, iar factorii *nonself* sînt reprezentați de material străin. Un sistem imunitar care nu funcționează normal poate să-și îndrepte acțiunea asupra componentelor normale ale propriului organism și atunci apar așa-numitele boli autoimune.

Definiția imunității implică de la sine un mecanism ereditar. Armele de luptă folosite de sistemul imun sînt anticorprii. Ei sînt sintetizați de către limfocite. Limfocitele sînt de trei feluri: T, B și K. *Limfocitele T* se diferențiază în timus, secretă substanțe numite *limfokine*. Acestea sînt toxice pentru agenții patogeni, distrugîndu-i. Ele sînt de asemenea implicate în eliminarea grefelor. *Limfocitele B* sintetizează anticorprii. S-au mai descris și *limfocitele K*, care facilitează acțiunea anticorpriilor. Ele se mai numesc celule ucigașe (*killer*). După ce agenții patogeni au fost anihilați, intervin macrofagele înarmate cu un complex echipament enzimatic hidrolitic care curăță terenul.

Anticorprii sînt sintetizați ca răspuns la prezența în organism a diferitelor antigene. Antigenul poate fi reprezentat de proteine, hidrați de carbon, acizi nucleici sau alte molecule.

* L. Gavrilă. Triumful vieții și treptele apărării sale, Știință și tehnică, nr. 6, 1981.

Anticorpul formează cu antigenul un complex antigen-anticorp care este mai ușor distrus de către mecanismele fiziologice de apărare decât antigenul singur. Există o mare diversitate de antigeni împotriva cărora este formată o diversitate egală de anticorpi. Un anticorp se va combina numai cu un anumit antigen sau cel mult cu câțiva antigeni foarte înrudiți. O celulă plasmatică matură produce numai un singur tip de anticorpi (sînt produse circa 2000 molecule de anticorp pe secundă timp de câteva zile). Specificitatea unui anticorp constă în unicitatea secvențelor de aminoacizi din cele două situri specifice ale sale de cuplare cu antigenul.

Anticorpii sînt compuși de natură proteinică și se mai numesc *imunoglobuline*.

Toate moleculele imunoglobulinelor sînt alcătuite din 2 catene polipeptidice ușoare — L ($kappa$ — K și $lambda$ — λ) și 2 catene polipeptidice grele — H din următoarele tipuri: *alpha* — α , *gamma* — γ , *miu* — μ , *delta* — δ și *epsilon* ϵ — și care diferă după secvența de aminoacizi a regiunii constante (C). Atît catenele ușoare cît și cele grele au cîte o regiune aminoterminală variabilă (V) și o regiune carboxiterminală constantă (C). Regiunile V și C ale unei catene L sau ale unei catene H sînt codificate de gene separate, care cooperează la nivelul transcrierii, ducînd la sinteza unei catene polipeptidice unice de tip L sau de tip H . S-a descris o imunoglobulină A (Ig A) care apără mucoasele, o imunoglobulină G (Ig G) reprezentînd 7% din totalul imunoglobulinelor și fiind cea mai importantă, o imunoglobulină M (Ig M) reprezentînd 1% din totalul imunoglobulinelor și imunoglobulina E (Ig E), responsabilă de hipersensibilitatea specifică de tip imediat. Imunoglobulina M se mai numește anticorp timpuriu, fiind prima care ia contact cu antigenii noi.

Există un sistem de antigeni umani care apar în urma unei reacții primare de apărare cu ajutorul sintezei anticorpilor a organismului față de antigeni ce invadează organismul și în care pot fi eliberați produșii antigenici. În acest caz apare un nou răspuns numit răspuns secundar în care intervin limfocitele T și B. S-a admis că leucocitele au la suprafața lor ca și hematiile, antigeni. Acești antigeni umani leucocitari (HLA) sînt specificați de gene localizate pe cromozomul 6, cuprinzînd patru loci genici diferiți A, B, C și D în care se află $\leftrightarrow$ mai multe alele: $A_1 \rightarrow A_{16}$, $B_1 \rightarrow B_{20}$ și $C_1 \rightarrow C_5$. Pot fi însă și mai multe variante alelice, ceea ce face ca fiecare individ uman să aibă propriul său

sistem HLA caracteristic, unic. În acțiune intervine mai întâi produsul genei *D*, după care intervin produșii genelor *A*, *B*, și *C*.

Existența unei reglări genetice a răspunsului imun a fost stabilită în anul 1943 de către Scheibel care, prin selecție, a obținut două categorii de cobai, una bună producătoare de anticorpi și alta slabă producătoare de anticorpi față de anatoxina difterică. În anul 1963, Benacerraf a descoperit genele care controlează în mod specific răspunsul imun față de antigeni simpli. În anul 1970, Biozzi evidențiază existența unui sistem poligenic în producerea de anticorpi.

Răspunsul imun față de antigeni simpli este controlat de mai multe gene autozomale dominante. Animalele care posedă aceste gene numite gene ale răspunsului imun, sau gene *Ir*, răspund viguros la antigene corespunzătoare, pe de-o parte prin producerea de anticorpi iar pe de altă parte prin dezvoltarea unei hipersensibilități întârziată. Animalele care nu posedă genele *Ir* în stare dominantă, nu sînt capabile de a da un răspuns imun.

Controlul genetic al răspunsului imun se exprimă direct la nivelul celulelor imunocompetente și nu prin intermediul factorilor umorali de tipul endocrinilor. Ansamblul de gene autozomale dominante ce controlează răspunsurile față de diferite antigene sintetice la șoarece aparțin aceluiași locus numit *Ir*—1. Este deci un exemplu tipic de alelism multiplu sau polialelie. (*Ir*—1A, *Ir*—1B, *Ir*—1C). Unele răspunsuri imune sînt controlate de 2 gene distincte *Ir*, cu efect de complementaritate.

La șoarece s-a stabilit că locusul *Ir*—1A se află în regiunea H—2 de pe cromozomul 17 la stînga locusului *Ss Slp* care controlează producerea unei β -globuline și la dreapta locusului H—2K care codifică antigene H—2 care stimulează reacția limfocitară mixtă, numite încă antigene LD (fig. 92).

Reglarea genetică a producerii anumitor anticorpi este controlată de gene care nu sînt situate în complexul H—2. Este cazul îndeosebi al anticorpilor dirijați contra „peptidei în buclă” a lizozimului. Rezultate asemănătoare au fost obținute la cobai, la care genele PLL, GA și BSA—1 sînt lincate în locusul ce codifică antigenele majore de histocompatibilitate la linia 2. La șobolan locusul major pentru histocompatibilitate este desemnat Ag—B.

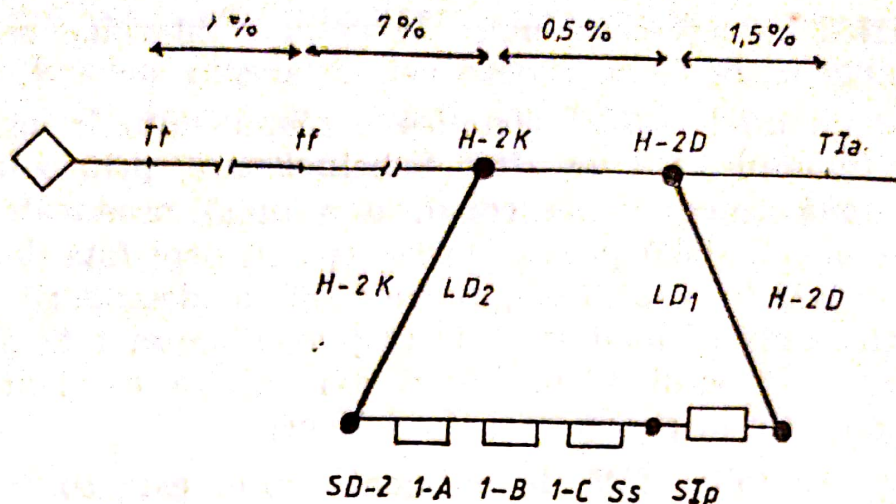


Fig. 92. Complexul major de histocompatibilitate la șoareci (cromozomul 17, grupa a 9-a de lincaj).

2. IMUNOGENETICĂ UMANĂ

În anul 1900, Landsteiner a descoperit că serul unor persoane aglutinează globulele roșii ale altor persoane, descriind pentru prima dată două *alloantigene* A și B, iar în 1910 Von Dungern și Hirsfeld demonstrează transmiterea ereditară a acestor antigene. Aceasta a reprezentat prima demonstrație a polimorfismului uman și totodată debutul științific al transfuziilor. Despre determinismul genetic al grupelor sangvine s-a vorbit la analiza fenomenului de polialelie. Acum se relatează unele aspecte referitoare la determinismul genetic al răspunsului imun la om.

Anticorpii sau imunoglobulinele reprezintă molecule proteice oligomerice. La om s-au descris cinci clase de imunoglobuline care au fost notate *IgG*, *IgA*, *IgM*, *IgD* și *IgE*. Fiecare imunoglobulină conține două tipuri distincte de catene polipeptidice, catene grele (H) și catene ușoare (L) unite prin punți disulfidice (S—S), formînd o moleculă complexă de forma literei y. Catenele ușoare au circa 215 aminoacizi cu o greutate moleculară de 23 000 daltoni, pe cînd cele grele au circa 440 aminoacizi, avînd o greutate moleculară de 55 000 daltoni.

Cea mai importantă clasă de imunoglobuline este clasa *IgG*. Molecula unei *IgG* conține patru catene polipeptidice, două identice grele și două identice ușoare. Aceste catene sînt astfel așezate în cadrul moleculei *IgG* încît conferă acestuia formă bifurcată (fig. 93).

Molecula de imunoglobulină prezintă o regiune variabilă și o regiune constantă. Regiunea variabilă a imunoglobulinei în-

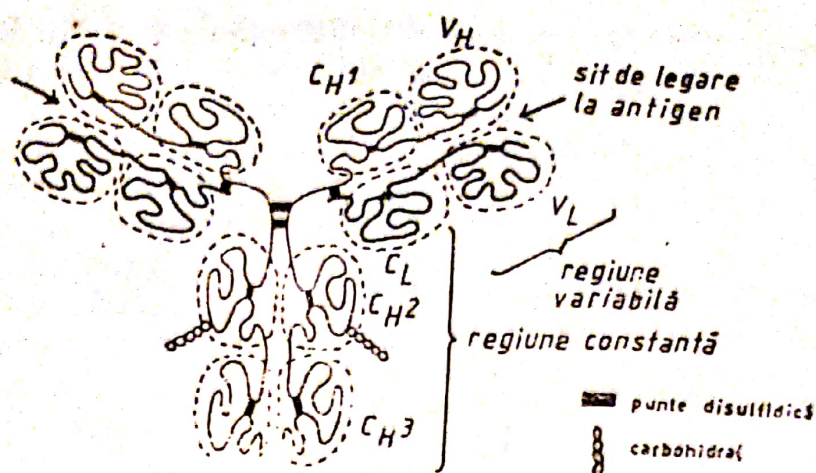


Fig. 93. Modelul de structură a moleculei imunoglobinei umane IgG. Linia subțire reprezintă catenele polipeptidice grele, pe când linia groasă reprezintă catenele polipeptidice ușoare. Cadrele delimitate prin puncte reprezintă domenii compacte în care se pliază regiunile variabile ale catenelor grele (VH) și ușoare (VL) și regiunile de omologie în regiunea constantă a catenei grele (CH₁, CH₂ și CH₃). VH, VL — catena grea și catena ușoară a regiunii variabile. CL — catena ușoară a regiunii constante. (după Goodenough și Levine, 1974).

teracționează cu antigenul (fig. 94). La capătul fiecărui braț al bifurcației (Y) se află situl de legare a antigenului care constă dintr-o adâncitură rezultată în urma plierii regiunilor N terminale ale catenelor cooperante ușoară (L) și grea (H). Fiecare moleculă Ig are deci două situri identice de legare a antigenului.

Orice tip de catenă H se poate combina cu oricare din cele trei tipuri de catene L desemnate K, λ_1 și λ_2 spre a forma o moleculă funcțională de Ig.

Fiecare persoană produce 10^4 — 10^6 tipuri diferite de molecule Ig.

Secvențele de aminoacizi din structura primară a catenelor ușoare și grele sînt variabile, izotipic, idiotipic și alotipic. Variațiunile izotipice apar în cadrul indivizilor și pot fi recunoscute serologic și chimic. Ele se datoresc apariției a două clase primare de catene ușoare numite kappa și lambda aflate în proporție de 70% respectiv 30% în serul uman și a trei clase de catene grele numite γ (gamma), α (alpha) și μ (miu) aflate în proporții de 70—80%, 15—20% și respectiv 5—10%. Cele 5 clase majore de imunoglobuline pot fi caracterizate prin tipul general de regiune C_H pe care îl conțin, fiecare regiune avînd o secvență distinctă de aminoacizi. Astfel, IgG posedă tipul γ

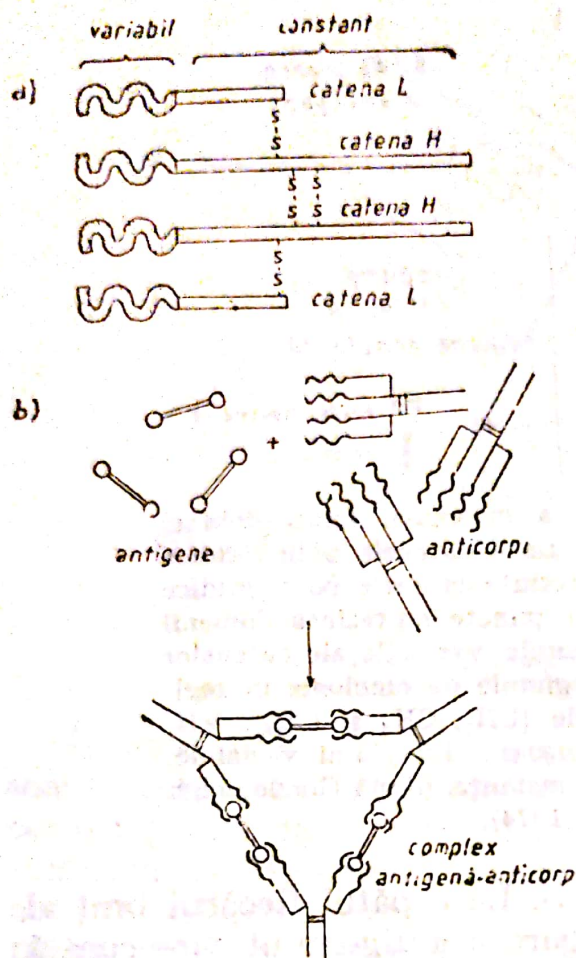


Fig. 94. Reprezentarea schematică a unei molecule imunoglobulinice (a) și a uneia dintre căile pe care aceasta se leagă la un anumit antigen (b). Se reprezintă formarea complexului antigen-anticorp prin legarea unui antigen bivalent bipolar într-un aranjament trimer (după Strickberger, 1976).

de regiune C_H , IgM posedă regiuni $C_H \mu$ iar IgA posedă regiuni $C_H \alpha$.

Variația idiotipică apare în cadrul indivizilor și este responsabilă de imensa diversitate a structurii imunoglobulinelor. Variația alotipică apare între indivizi și prezintă ereditate de tip mendelian. La om și alte mamifere caracterele purtate de catenele ușoare sînt moștenite independent de caracterele purtate de catenele grele.

Regiunile variabile ale fiecărei molecule IgG sînt acelea care interacționează specific cu un anumit antigen din care cauză regiunile V sînt cele mai diverse, sistemul imun conținînd mii de tipuri specifice de molecule imunoglobulinice.

Regiunea constantă, de fapt impropriu numită astfel, conține catene grele și ușoare ca și regiunea V și ea nu înseamnă că este invariabilă. Ea este totuși relativ constantă în comparație cu regiunea V. Regiunea constantă este însă implicată într-o activitate comună tuturor moleculelor imunoglobulinelor și anume atașarea la su-

prafața celulelor de unde și relativa sa constantă comparativ cu regiunea variabilă implicată și atașarea la antigen.

Un mamifer poate sintetiza mii de tipuri diferite de imunoglobuline (anticorpi). Fiecare dintre ele se poate complexa cu un anumit antigen sau o familie de antigene, scoțindu-le din țesuturi sau sînge.

Diversitatea enormă a anticorpilor permite sistemului imun să răspundă la o varietate mare de antigene, incluzînd cele care aparțin la aceeași specie (*self-antigene*). Sistemul imun are capacitatea de a răspunde predominant față de antigene străine

(*non-self-antigene*), capacitate bazată pe absența genelor care codifică anticorpi cu reactivitate *anti-self* sau pe un mecanism de memorizare care previne ca asemenea anticorpi să fie induși. Necesitatea unui mecanism de memorizare în discriminarea imunologică *self-nonsel*f este cerută de marea diversitate a răspunsului imun.

Imunoglobulinele sînt sintetizate în celulele plasmei sanguine și probabil în precursorii lor limfocitari. Fiecare celulă plasmatică prezintă o înaltă specificitate de a sintetiza doar una sau puține tipuri diferite de imunoglobuline. Rezultă că un organism conține mii de clone celulare plasmatice diferite, fiecare specializată în sinteza unei anumite sau unui anumit grup de imunoglobuline. Sinteza de imunoglobuline nu necesită neapărat prezența unui antigen în calitate de stimulator. Astfel, dacă o celulă din plasma sangvină de la om este determinată să sintetizeze un anticorp împotriva proteinei capsidei virusului *smallpox* (variolă), numit *antipox*, celula plasmatică și descendența sa clonală sintetizează anticorpii antipox toată durata lor de viață, indiferent dacă îl întâlnesc sau nu proteina *smallpox*. Dar, în prezența antigenului are loc reacția de complexare antigen-anticorp *antipox* localizat la suprafața celulelor plasmatice specializate în producerea antipoxului.

Reacția stimulează celulele plasmatice spre a desfășura multe cicluri de diviziune care vor da naștere unei clone de celule plasmatice antipox. Aceste celule pot secreta în serul sangvin o mare cantitate de anticorpi antipox. Pe această bază se realizează imunizarea persoanelor prin inoculare cu forme atenuate de virusuri patogene.

3. GENELE PENTRU IMUNOGLOBULINE

Porțiunile constante și cele variabile ale catenelor *L* și *H* sînt codificate de gene diferite. Astfel, patru gene structurale cooperează spre a sintetiza o moleculă de imunoglobulină *Ig*. În anul 1965, Dreyer și Bennett au emis ipoteza două gene — o catenă polipeptidică, după care regiunile *V* și *C* sînt separat codificate și ele sînt asociate printr-un eveniment de împreunare. Ulterior s-a dovedit că într-adevăr genele pentru catena *K* (*Kappa*) au segmente *V* și *C* separate care sînt rearanjate spre a forma o genă activă *K*. Recent, Yamawaki și colab. (1980) au

stabilit secvența completă de nucleotide a genei catenei imunoglobulinice γ 2b clonată din ADN de șoarece nou-născut (clasa catenei γ conține 3 sectoare și o regiune de articulație și este divizată la șoarece în mai multe subclase precum γ_1 , $\gamma_{1.2}$, γ_{2b} și γ_3).

Cercetări de hibridare ADN complementar — ARN^m pentru diferite subclase ale clasei catenei γ sugerează că genele catenei grele imunoglobulinice ale subclaselor γ au evoluat printr-o duplicație genică recentă a genei ancestrale a catenei γ . Secvențierea a dus la concluzia că cele trei sectoare și regiunea de articulație ale catenei γ sînt codificate în regiuni diferite ale ADN. Secvența codificatoare pentru catena γ 2b este întreruptă prin 3 secvențe de interpunere (IS) la situri analoage cu cele din secvența genică γ 1 și anume la joncțiunea sectoarelor cu regiunea de articulație.

Gena *Ck* din linia germinală este organizată astfel că în cadrul secvenței codificatoare se află secvențe necodificatoare numite secvențe de legătură sau interpose (joining) sau secvențe *J*. Integrarea implică fuziunea unui segment *Vk* cu unul dintre segmentele *J* și secvența interpusă este eliminată post-transcripțional prin intervenția unor enzime asupra ARN transcris de pe gena *Ck* (Rabbitts, 1980). La imunoglobulina de șoarece s-a constatat că regiunile variabile ale catenelor kappa sînt codificate de mai multe segmente genice variabile (*V*) și mai multe segmente genice de legătură interpose (*J*). Segmentele genice *Vk* codifică resturile 1—95 iar cele *Jk* codifică resturile 96—108. Această organizare genică este similară cu aceea care codifică regiunile *V λ* . Diversitatea regiunilor *Vk* rezultă pe mai multe căi (Weigert și colab., 1980);

- existența unor multiple segmente genice *Vk* și *Jk* din linia germinală;

- combinarea segmentelor genice *Vk* cu diferite segmente *Jk* din linia germinală;

- mutație somatică punctiformă pentru segmentele *Vk* așa cum s-a postulat și pentru secvențele genice *V λ* . În sistemul genic al catenei *H*, *C μ* ar fi clasa de catene *H* exprimată inițial. În expresia genei catenei *H* are loc o schimbare a catenei *H* care este manifestată prin predominarea *IgM* (clasa catenei μ) în răspunsul imun primar și de predominarea lui *IgG* (clasa de catene γ) în răspunsul secundar. Etapa terminală a acestei căi poate fi în unele cazuri o schimbare care duce la sinteza de *IgA* (clasa catenei α). La nivelul ADN această schimbare pare a implica o genă *V_H* exprimată mai întîi cu o genă *C_H* (precum *C μ*)

și apoi fiind schimbată din această genă C_H într-una diferită precum C_γ și apoi fiind schimbată la o altă genă diferită (C_α). O caracteristică esențială a acestei schimbări este expresia unui idiotip al regiunii V cu diferite clase C_H . S-au propus mai multe modele spre a explica acest fapt:

1) modelul de inserție secvențială după care un eveniment inițial integrează o genă V_H cu o genă C_μ și ulterior această genă V_H este reintegrată cu o genă C_λ și în final cu C_α ;

2) modelul de inserție multiplă în care are loc integrarea de copii ale genei V_H cu fiecare genă C_H ;

3) modelul post-transcripțional în care este implicat un singur eveniment de integrare la cea mai distală parte a șirului de gene C_H . Gena V_H plus șirul genic C_H este transcisă ca o unitate într-un ARN precursor care va da combinația $V_H - C_H$ prin prelucrarea ARN;

4) modelul deleției — în cadrul căruia se admite că integrarea apare între o genă V_H și o genă C_H cu schimbarea ulterioară, facilitată de deleția materialului dintre gena V_H integrată și gena C_H următoare.

În general celulele animalelor heterozigote exprimă ambele alele la un locus particular. Singurele excepții sînt celulele cu genotipul XX după inactivarea unui cromozom X la femelă și celulele producătoare de imunoglobulină: în fiecare din aceste cazuri doar una din cele două alele este exprimată în celulele diferențiate și descendența lor. Acest fenomen numit *excluzie alelică* a fost descris la numeroase specii de animale incluzînd omul și șoarecele. S-a arătat că genele pentru regiunea constantă (C) și pentru regiunea variabilă (V) de imunoglobulină suferă un rearanjament în timpul ontogeniei. S-a dovedit că acest rearanjament al genelor imunoglobulinice apare doar pe unul din cei doi cromozoni omologi ce poartă aceste gene (Joho și Weissman, 1980).

Genele C_H sînt gene înrudite dar distincte, strîns lincate care suferă mutații spre a da o mulțime de alele. Secvența de aminoacizi a produsului fiecărei subclase C_H este distinctă dar înrudită cu celelalte din clasa sa, fiecare subclasă fiind specificată de o genă distinctă. La om patru regiuni $C_H\gamma$ sînt specificate de genele $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ și γ_4 . Există două gene α (α_1 și α_2) și două gene μ (μ_1 și μ_2). Genele C_H ale unei subclase sînt strîns lincate, reprezentînd izoloci așezați în tandem. Aceasta seamănă cu organizarea genelor pentru hemoglobină. Ca și în cazul hemoglobinei s-a admis că aceste gene au derivat dintr-o secvență nucleotidică inițială care a suferit o serie de duplicații și apoi au constituit obiectul unei evoluții divergente. Astfel, toate genele C_H, γ, μ , și α sînt strîns

lincate și derivă dintr-o singură familie de gene. Gena γ_1 are două alele ce condiționează sinteza de polipeptide care au fie arginină, fie lizină în poziția 214 a catenei γC_H .

În imunogenetică alelele se numesc *variante alotipice*. Genele C_H se caracterizează printr-o particularitate deosebită: fiecare locus reprezintă o genă deși fiecare specifică numai o porțiune a unei catene polipeptidice grele, regiunea V_H a fiecărei catene grele fiind specificată de o a doua genă diferită de cea care specifică regiunea C_H . Este vorba deci de o abatere de la dogma o genă — o catenă polipeptidică fiind o situație redată sub formularea două gene — o catenă polipeptidică. Deși această concepție nu a fost dovedită, ea se bazează pe unele date indirecte și anume existența unei varietăți enorme de secvențe V și numai a unui număr mic și fix de secvențe C . Cea mai simplă explicație a apariției a mii de combinații VC este admiterea faptului că în celulele somatice, cel mai probabil în celulele plasmei sangvine, informația V se combină direct cu informația C . Pentru aceasta trebuie stabilit dacă genele V_H și C_H , pe de o parte și genele V_L și C_L pe de alta sînt lincate. Pentru stabilirea lincajului dintre gene trebuie să avem la dispoziție o pereche de markeri alelici pentru fiecare locus care segregă în meioză spre a da fenotipuri distincte. Asemenea variante alotipice (markeri alelici) s-au evidențiat la om pentru regiunile C atît pentru catenele grele cît și pentru catenele ușoare. Pentru regiunile V , existența a mii de polipeptide înrudite, prezente în același organism uman face imposibilă identificarea adevăraților heterozigoți. La iepure însă s-au identificat anumite alele aparente ale genelor V_H și C_H .

Se admite cel mai adesea că există lincaj în toate cazurile în care doi loci genici V și C sînt destinați să dirijeze sinteza unei singure polipeptide.

Genele umane V_H pot interacționa cu numeroase clase de gene C_H . Locii numiți K interacționează totdeauna cu K iar locii λ cu λ . În cazul locilor K , trei gene distincte dictează trei subgrupe distincte de V_K , pe cînd o genă dictează sinteza lui C_K . De asemenea cinci loci sînt implicați în sinteza V_λ și doi în sinteza C_λ . La un punct oarecare în formarea fiecărei catene K informația unui locus C are opțiunea de a interacționa cu informația de la trei loci diferiți V iar în formarea catenelor λ interacționează doi loci C și cinci feluri diferite de loci V . Există deci o mare flexibilitate atît în sinteza catenelor ușoare cît și în sinteza catenelor grele. Această combinație poate apare teoretic la trei nivele diferite: al genei, al transcriptului sau al produsului genic. În primul rînd poate avea loc fuzionarea de gene separate în

cadru unei celule a plasmei înainte de a fi transcrise. Apoi poate avea loc fuzionarea de diferite molecule de ARNm înainte de a fi traduse. În sfârșit, poate avea loc fuzionarea de polipeptide separate spre a forma o singură polipeptidă.

Dimensiunea poliribozomilor din celulele plasmei sangvine este în acord cu existența doar a două tipuri de polipeptide sintetizate, unul greu și altul ușor, ceea ce exclude posibilitatea fuziunii la nivel polipeptidic. Mai probabilă apare fuziunea de gene, fapt bazat pe studiul iepurilor heterozigoți de tip $\frac{Aa1 \ A14}{Aa2 \ A15}$ care produc numai catene grele $Aa \ 1 \ A14$ sau $Aa \ 2 \ A15$ și nu catene hibride $Aa1 \ A \ 15$ sau $Aa \ 2 \ A \ 14$. Este o conservare a lincajului admitând că $Aa \ 1$ și $A \ 14$ respectiv $Aa \ 2$ și $A \ 15$ reprezintă două gene care au fuzionat în celulele plasmei sanguine și au fost transcrise într-o singură moleculă de ARNm.

Fuziunea de material genetic apare și în cazul inserției episomului în cromozomul bacterian și s-a propus un model asemănător pentru crearea genelor mature pentru imunoglobuline în care se implică excizia, migrarea și integrarea materialului genetic.

Un alt model admite recombinarea selectivă dintre genele V și C în același cromozom, dar interacțiunile genă-genă și sinteza imunoglobulinelor rămân complet neelucidate.

După modelul elaborat de Capra și Kindt (1975) numit modelul hipervariabil de inserție, are loc o interacțiune a cel puțin 3 gene spre a forma fiecare catenă polipeptidică a imunoglobulinei. La baza modelului stă conceptul fundamental că porțiunea relativ nevariabilă a regiunii variabile este codificată de un număr foarte limitat de gene din linia germinală (1 pînă la 5 gene pe subgrup). Al doilea grup de gene (50—100) ar codifica o treime din regiunea variabilă care este hipervariabilă. Aceste gene hipervariabile ar putea interacționa cu subgrupul de bază al genei prin translocație, inserție episomală sau procese de recombinare spre a forma regiunea variabilă completă a genei (fig. 95).

Un mecanism de translocație ar uni apoi aceste gene la regiunea constantă a genei spre a forma o genă completă ce codifică întreaga catenă polipeptidică.

Porțiunea constantă a regiunii V s-ar manifesta și ar evolua ca o singură genă.

Din secvențierea completă a catenelor grele ale imunoglobulinelor umane s-a stabilit că există același număr de poziții invariabile în treimea N și C — terminală a catenei grele.

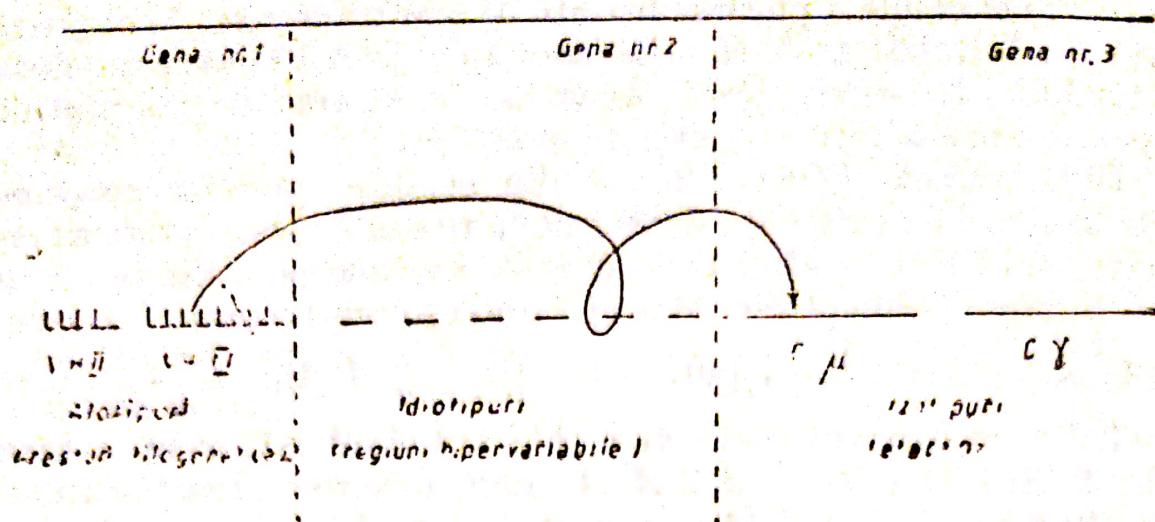


Fig. 95. Modelul inserției privind interacțiunea genelor pentru catenele grele ale imunoglobulinei. Săgeata indică selecția unei gene din fiecare grup înainte de sinteza unei catene grele complete.

S-a tras concluzia că în cursul evoluției a fost păstrată o anumită structură care stă la baza diferențelor dintre porțiunile N și C terminale ale regiunii V_H .

După modelul hiper-recombinării are loc o recombinare intracromozomală care duce la excizia dintr-un cromozom a unei molecule epizomale de ADN ce codifică o singură regiune V. Gena aceasta V trece la o genă vecină C pe același cromozom, fiind inserată adiacent acestei gene prin acțiunea unei enzime foarte specifice de integrare. Prin acest model se poate explica atât translocarea genică cât și variația de secvență. Acest model care încearcă să explice unirea genelor V și C este comparabil cu modelul de lizogenie fagică.

Au mai fost propuse și alte modele spre a explica nașterea complexelor genice V și C. Astfel sînt: modelul alegerii programate a copiei, care admite prezența unui segment ADN ce codifică o secvență completă VC; modelul alegerii copiei cu intrare multiplă; modelul rețelei ADN.

Tot astfel, modelul helixului rotativ propus de Thomas în 1973 pentru genele eucariote, a fost postulat a sta la baza mecanismului de translocare a genei V și unirea acesteia cu gena C.

Potrivit modelului alegerii programate a copiei are loc un mecanism de recombinare genetică nereciprocă pe baza unei replicări de tip conservativ a unei porțiuni din ADN ce corespunde genelor comune pentru răspunsul imun (I_r), ca matriță, servind o regiune a dublei elice ADN care deține informația

genetică corespunzătoare acestor gene specifice. Replicarea are loc după o rupere prealabilă a catenei ADN cu gene comune la nivelul unei regiuni cu secvență programată care este recunoscută de un adaptor de specificitate ce conține anticodoni specifici și care poate fi un ARNt. Întreaga regiune la nivelul căreia se desfășoară recombinația se află înfășurată într-un *replison*, un element ce condiționează funcționarea acestei regiuni în recombinația reciprocă. Desigur, modelul implică enzime corespunzătoare de tăiere a catenei (endonucleaze) și de unire a capetelor libere (ADN-ligaza). După recombinație ne-reciprocă o aceeași moleculă de ADN conține secvențe ce reprezintă informația ereditară atât pentru regiunea variabilă, cât și pentru regiunea constantă a imunoglobulinei, dispuse în imediată vecinătate.

Modelul rețelei ADN admite existența unei structuri politenice cuprinzând 16 filamente la nivelul regiunii corespunzătoare informației pentru genele variabile și a unui singur sit promotor atât pentru transcrierea regiunii variabile cât și pentru transcrierea regiunii constante la nivelul căreia există doar patru filamente cromatinice.

În cadrul modelului bifurcației de replicare propus de Fincham și Sastry în 1974 se admite transpoziția genei V de o manieră asemănătoare transpoziției elementelor transpozabile de la porumb.

În esență modelul admite translocarea unei gene abia replicate la o genă replicată sau aflată în replicare, adiacentă bifurcației de replicare, fie pe același ADN dublu-catenar, fie pe catena fiică a ADN. Această translocare produce de fiecare dată o celulă obligată și o celulă opusă — neobligată.

Translocările ulterioare în celulele obligate (determinate) pot produce celule inversate, capabile de a produce atât IgM cât și IgC ca și celule programate spre a produce o singură clasă de imunoglobuline, fie IgM, fie IgC.

Mecanismul de translocare poate fi analog sistemului lizogenic fagic sau elementelor de control transpozabile de la bacterii sau de la porumb.

În sfârșit s-a propus și modelul eliminării de ADN bazat pe mecanismul apariției de mutante *petite* la drojdii. Pe baza sa o pereche de gene VC poate apare din unirea lor fără a fi necesară deplasarea genei V din cromozom. Genele V sînt aranjate în tandem în cromozom în apropierea genei C. O genă dată V poate fi adusă în imediată vecinătate a genei C pe calea deleției unora dintre genele V. Acest mecanism ar implica

un eveniment recombinatoriu dintre secvențe nucleotidice foarte similare. Delețiile fiind randomizate pot fi generate toate combinațiile posibile VC.

Cele mai simple explicații sînt oferite de modelul alegerii copiei cu intrări multiple și mai ales de modelul bifurcației de replicare.

Regiunile C_L la imunoglobulinele umane sînt de două tipuri C_λ și C_K , avînd secvențe de aminoacizi diferite. Porțiunea C_K este specificată de o genă numită *Inv* care se află sub forma a două alele, *Inv* (1) și *Inv* (3). Prima alelă condiționează prezența leucinei în poziția 191 pe cînd cea de-a doua alelă condiționează prezența valinei în această poziție. Porțiunea C_λ este specificată de două gene separate, una care condiționează prezența lizinei, alta care condiționează prezența argininei în poziția 190. Este vorba deci de existența unor loci nelincați ce specifică polipeptide ce vor fi ulterior unite prin punți disulfidice spre a forma o proteină unică. Este de asemenea o situație asemănătoare cu aceea întîlnită la interacțiunea catenelor α și β sau α și γ ale hemoglobinei deși în cazul hemoglobinei nu apar punți disulfidice.

Regiunile V_L reprezintă primii 107 aminoacizi ai catenei ușoare, începînd de la capătul N-terminal. Există mai multe tipuri de secvențe caracteristice regiunilor V_L . Unele dintre aceste secvențe se asociază numai cu regiunile C_λ , altele numai cu regiunile C_K , putîndu-se astfel diferenția regiuni V_K și V_λ . Toate catenele ușoare vor fi de tip $V_K C_K$ sau $V_\lambda C_\lambda$.

La om s-a admis existența a trei clase diferite de gene V_K nealelice și a cinci subgrupe de gene V_λ nealelice.

De asemenea au fost recunoscute cel puțin două subclase V_H . O deosebire importantă dintre V_L și V_H este că un tip dat de regiune V_H se poate asocia cu mai mult de o clasă a regiunii C_H (γ , μ sau α). Deci în catena grea nu apare o specificitate $V_K C_K$ și $V_\lambda C_\lambda$. Regiunile variabile ale imunoglobulinelor, atît în catenele ușoare cît și în cele grele se caracterizează prin marea lor diversitate, de ordinul a miilor de secvențe unice dar înrudite de aminoacizi.

Pentru a se explica enorma variabilitate a secvențelor de aminoacizi din catenele grele sau ușoare ale imunoglobulinelor secvenței care sînt unice dar înrudite, au fost emise două ipoteze: ipoteza liniei germinale și ipoteza mutației somatice.

Conform ipotezei liniei germinale genomul conține mii de gene unice dar înrudite, fiecare specificînd una din nenumăratele regiuni V sintetizate într-un organism. Familiile de gene actuale au derivat prin duplicația extensivă a unei secvențe genice inițiale specifică fiecărei subclase de catene polipeptidice V, gene

care au fost generate în decursul evoluției și care sînt moștenite în maniera mendeliană. Conform acestei ipoteze o mare parte din genomul mamiferelor este specializat în deținerea unor asemenea clase de gene, fiecare persoană moștenind și transmițînd prin linia germinală genele $V_{\lambda} Ia'$, $V_{\lambda} Ib'$... $V_{\lambda} In'$, $V_{\lambda} IIa'$, $V_{\lambda} IIb'$ $V_{\lambda} IIIn'$ ș.a.m.d. Fiecare celulă plasmatică va exprima selectiv numai una din aceste gene pentru regiunea V a catenei ușoare și numai una din genele caracteristice pentru regiunea V a catenei grele. Cele mai multe celule plasmatice vor selecționa combinațiile de gene ce trebuie exprimate potrivit unui anumit reglaj al activității genice, astfel că organismul prezintă o vastă diversitate de celule producătoare de imunoglobuline.

Ipoteza liniei germinale nu poate explica unele aspecte, de exemp'lu cum este posibil ca iepurele și omul să aibă secvențe diferite de aminoacizi în subclasele lor V_K deși s-ar putea argumenta că cele două specii de mamifere au suferit un proces independent și extensiv de duplicație genică după ce a avut loc divergența lor prin mutație. Dar nu se știe dacă a fost suficient timp pentru o asemenea mare evoluție divergentă din momentul în care cele două specii au urmat căile evolutive separate.

Ipoteza mutației somatice admite că numai un număr mic de gene V se transmite de la genitori la descendenți, prin procesul de fecundare, eventual trei gene V_K , cinci gene V_{λ} și puține gene V_H . Aceste gene suferă apoi mutații somatice nenumărate la nivelul diferitelor linii celulare plasmatice spre a genera enorma diversitate a secvențelor de aminoacizi din catenele polipeptidice V. Pe această cale rezultă clone celulare plasmatice care poartă diferite gene V. O clonă poartă genele $V_{\lambda} Ia'$ și $V_{\lambda} IIc'$, altă clonă poartă genele $V_{\lambda} Ib'$ și $V_{\lambda} IIc'$ ș.a.m.d. Dintre aceste gene vor fi selecționate prin mecanisme reglatorii două spre a fi exprimate într-o anumită clonă celulară a plasmei sangvine.

Ipoteza mutației somatice nu poate explica marea frecvență de mutație ce ar fi trebuit să se înregistreze într-un tip special de celulă cum este cel al celulelor plasmei sangvine și caracterul dirijat, nerandomizat în care ar fi trebuit să se desfășoare procesul mutagen (știut fiind că mutația are caracter întâmplător) deoarece pozițiile unor anumiți aminoacizi într-o subclasă dată V sînt foarte variabile, pe cînd altele sînt fixe.

După o altă ipoteză înainte de diferențiere toți locii eucromatici implicați în imunitate se crede că sînt heterocromatizați. Cînd o celulă este stimulată să producă Ig , ea își eucromatizează gena V_H . De la aceasta se desfășoară un val de

eucromatinizare în același cromozom pînă ce este inclusă în eucromatinizare și o genă C_H . De asemenea o genă V_L este eucromatinizată împreună cu o genă C_L . Prin aceasta se ajunge la sinteza unei molecule complete de *Ig*. Polipeptidele V_H și C_H pot fi unite după ce au fost sintetizate, sau pot fi unite la nivelul ribozomului dacă un asemenea ribozom traduce mai întâi un ARN^m V și continuă apoi să traducă un ARN^m C, al doilea polipeptid fiind sintetizat la capătul primului.

Cele mai multe interpretări actuale ale mecanismului răspunsului imun se bazează însă pe ipoteza liniei germinale.

4. INTERFERENȚĂ ȘI INTERFERON

Imunitatea pe care o dobîndește o celulă față de un virus ca urmare a unui contact prealabil cu o particulă virală se numește *interferență*.

Această imunitate nu este conferită de formarea unor anticorpi de tip antivirus, ci are la bază formarea interferonilor, molecule specifice care interferă cu multiplicarea virală. Fenomenul de interferență a fost descoperit în anul 1957 de către A. I. Saacs și J. Lindenmann care au izolat și identificat aceste molecule. Ei au constatat că o cultură celulară inoculată în prealabil cu virusul gripal inactivat, incapabil de a se multiplica și de a distruge celulele gazdă devine rezistentă la infecția cu același virus, de data aceasta aflat în stare activă. Acțiunea antivirală a interferonului pentru o anumită specie nu este limitată numai la virusul care i-a declanșat sinteza ci ea se manifestă inhibînd replicarea tuturor virusurilor de tip ARN sau ADN. Inițial considerat ca o substanță pur antivirală, după anul 1970 interferonul este considerat ca avînd proprietăți antiparazitare, antitumorale și anticelulare directe. În unele cazuri se vorbește despre rolul interferonului în reglarea activității acizilor nucleici în celula normală. În condiții normale sinteza interferonului este represată. Derepresia apare cînd în celulă au pătruns virusuri sau unele molecule de acizi nucleici.

Interferonul reprezintă o nouă clasă de proteine produse de către celulele animale ca răspuns la unele substanțe virale și uneori nevirale. Aceste proteine sînt produse în mod natural la toate vertebratele ca răspuns la infecția virală. Producerea

acestor interferoni este foarte diferită de producerea de anticorpi. Practic orice celulă a corpului poate produce interferoni. Sinteza interferonilor este foarte rapidă — la câteva ore de la stimulare — și totodată durata lor de viață este limitată, dispărînd la câteva ore sau zile după ce au fost produși.

Anticorpilor acționează la sfîrșitul infecției virale, pe cînd interferonul acționează la începutul infecției virale.

Interferonii de rezervă, păstrați într-o formă inactivă, de greutate moleculară mare, sînt produși de sistemul reticulo-endotelial.

Acțiunea interferonului nu se manifestă în cadrul unei reacții directe cu virusurile spre a le distruge infecțiozitatea, așa cum fac anticorpilor, ci se manifestă prin inhibiția replicării virusului, protejînd astfel celula și împiedicînd multiplicarea particulelor virale și diseminarea lor la alte celule.

După unele date interferonul poate induce sinteza unui represor în celula eucariotă care se leagă la ARNm viral și inhibă funcționarea sa.

Cercetările lui Dianzani și colab. (1980) au arătat că interferonul indus de virus (VIF) și interferonul indus experimental (IIF) de limfocite în urma activării sub influența diferiților mitogeni (fitohemaglutinia, concavalina A, enterotoxina A stafilococică) sau prin stimulare antigenică specifică (cu tuberculină, toxine bacteriene, antigeni virali) prezintă diferențe funcționale importante în activitatea antitumorală și imunoreglatoare. Celulele tratate cu IIF dobîndesc stare antivirală mult mai încet decît cele tratate cu VIF datorită diferențelor majore în mecanismele prin care IIF și VIF activează celulele.

În cazul ribovirusurilor, după pătrunderea ARN viral în celulă, acesta se replică, apărînd sub forma replicativă bicatenară (RF). Este depresată totodată gena celulară responsabilă de sinteza interferonului. Acesta împiedică funcționarea RF ca matriță pentru sinteza noilor catene virale (—) prin care se realizează multiplicarea virusului. Totodată, interferonul poate fi transportat pe cale sanguină sau umorală în alte teritorii, conferind celulelor imunitate față de infecția fagică.

Interferonul poate derepresa și alte gene din ADN celular care prin produșii lor împiedică transcrierea ARN viral. Interferonii — proteine semnal — sînt agenți antivirali de natură proteinică care interferă cu replicarea materialului genetic viral prezentînd specificitate de specie. Din această cauză, pentru a fi eficienți în tratarea unei boli virotice la om acești interferoni

trebuie produși în celulele umane. În culturi de celule sau de țesuturi umane se sintetizează o foarte mică cantitate de interferoni. Se pune din această cauză problema sintezei lor artificiale sau se pune problema găsirii unei substanțe chimice care să stimuleze sinteza de interferoni.

Interferonul joacă un rol foarte important în apărarea locală și rapidă a organismului pe când anticorpii sînt implicați în apărarea generală și de lungă durată. Eficacitatea interferonului a fost clar evidențiată în boli virotice precum gripa.



Capitolul XI

EREDITATEA COMPORTAMENTULUI INTELIGENȚEI ȘI MEMORIEI

Motto 1:

Dintre toate organismele, omul este cel care posedă cel mai deschis și cel mai elastic program genetic. Unde încetează însă elasticitatea? ... Care este partea din comportament prescrisă de gene? La ce constrângeri ale eredității este supus spiritul uman?

François Jacob, Logica viului

Motto 2:

„Tot ceea ce facem, tot ceea ce simțim se datorește eredității și mediului“.

Th. Dobzhansky

Motto 3:

„Ura, invidia și egoismul sînt cîștigate și nu moștenite. Agresivitatea nu este altceva decît un răspuns la frustrare“.

Montu — antropolog american

1. COMPORTAMENTUL ȘI DETERMINISMUL SĂU GENETIC

Comportamentul este în realitate o prelungire a dezvoltării. Reflexele au o bază structural-funcțională ca oricare altă activitate biologică. Diferitele caractere comportamentale la animale sînt determinate unigenic sau multigenic.

Comportamentul instinctiv avînd la bază reflexul necondiționat are un determinism strict genetic pe cînd învățarea are la bază reflexul condiționat, fiind în esență un produs al mediului, desigur realizat pe un anumit fond genetic. Astfel, comportamentul organismului ca și restul fenotipului său re-

prezintă rezultatul interacțiunii genotip-mediu. Bunăoară, în comportamentul animalelor de pradă apare un interesant mecanism de selecție dependentă de mediu, respectiv de densitatea prăzii. Astfel, păsările și mamiferele de pradă își aleg victimele dintre cele care aparțin tipului obișnuit și nu dintre cele care se abat de la normă.

La baza unui anumit comportament anormal stau alterări în structura și funcția unor organe. De exemplu „valsul șoarecelui” este un comportament anormal descris în China încă din antichitate, în care șoarecii „dansează cu coada în gură”. S-a stabilit că acest comportament este determinat de o genă recesivă iar indivizii homozigoți aleargă în cerc timp îndelungat. Gena are efect pleiotrop determinând surditatea bazată pe anomalii în structura urechii interne — degenerarea canalelor semicirculare și a canalului cohlear. Sînt și unele mutante non-alelice care se încadrează în acest comportament, cu particularitatea rotirii și scuturării capului asociată sau nu cu surditatea sau surditate neasociată cu rotirea sau scuturarea capului. S-a trans concluzia că morfogeneza urechii interne este controlată poligenic.

Curtarea la drosofilă a unei femele virgine de către un mascul cînd sînt introduși împreună în același vas de cultură are mai multe etape printre care vibrarea aripilor, deplasarea masculului în spatele femelei și linsul părții posterioare a abdomenului acesteia, după care masculul încearcă să realizeze copulația. Fără accepțiunea femelei care își întinde aripile și plăcile vaginale, masculul nu poate introduce phallusul spre a o fecunda. S-a stabilit că acest comportament este afectat de gena recesivă „yellow” X-lincată, cea care determină și culoarea galbenă a corpului drosofilei. Introducîndu-se în același vas de cultură masculul normal și masculul „yellow” cu o pereche de femele una normală, alta „yellow” s-a constatat că masculul normal a fost eficient în fecundarea atît a femelei normale cît și a femelei „yellow”. Diferența dintre masculul normal și cel „yellow” din punct de vedere al comportamentului la împerechere este că masculul „yellow” nu realizează în cadrul curtării prima etapă, aceea a vibrării aripilor, astfel că femela nu poate răspunde la curtarea sa, ea răspunzînd la curtarea realizată de masculul normal, părăsindu-l pe cel „yellow”. Gena „yellow” se dovedește și aici a avea efect pleiotrop.

S-au obținut, de asemenea, diferențe statistice semnificative pentru multe trăsături de comportament după numai cîteva generații de selecție la animale cu perioadă de reproducere re-

dusă precum drosfila, șoarece, șobolan. S-a mai demonstrat implicarea aparatului genetic în următoarele trăsături cantitative de comportament: intensitatea și sensul comportării fototactice și geotactice la drosfilă, agresivitatea intraspecifică la șoarece și performanța șobolanilor în anumite experiențe de învățare (Franck, 1974). Diferențele individuale intraspecifice referitoare la intensitatea și semnul reacției geotactice la *D. melanogaster* depind de numeroase gene distribuite în tot genomul. Diferențele de comportament au un determinism poligenic chiar și la cele mai inferioare organisme, mutațiile unice determinând numai o schimbare nesemnificativă în comportament care nu poate fi remarcată fenotipic. Mutațiile poligenice aduc însă modificări mari în comportament.

S-a constatat că în urma iradierii X se reduce capacitatea de învățare a labirintului la șobolani ca și o diminuare a agresivității la peștele *Cichlasoma nigrofasciatum*.

Schimbările evolutive în comportament pot să acționeze ca mecanisme de izolare etologică. Izolarea reproductivă parțială s-a realizat prin îndepărtarea heterozigoților apăruiți prin încrucișarea a două stocuri diferite de *D. melanogaster*.

Implicarea certă a bazei ereditare într-o trăsătură de comportament poate fi realizată numai atunci când pot fi urmărite segregarea și recombinarea caracterelor comportamentale. Dar analiza genetică a comportamentului este mult mai complexă și mai dificilă decât a altor trăsături.

Analiza genetică a diferențelor comportamentale cantitative întâmpină dificultăți metodologice severe.

Diferențele de comportament specifice fiecărei specii sînt datorate diferențelor genetice dintre ele. Apelurile sexuale ale hibridilor dintre diferite specii înrudite de anure nord-americane reprezintă intermediari față de cele ale formelor genitoare, deși hibridii nu se deosebesc morfologic față de genitori.

Comportamentul în delimitarea teritoriului față de invadatori (manifestat prin bătăi din coadă) la șopîrla hibridă *Anolis* rezultată din încrucișarea *A. trinitatis* × *A. aeneus* reprezintă exact intermediarul față de intervalul mediu dintre bătăile succesive de coadă ale părinților.

Diferențele în structura socială a două specii de Papio, *P. hamadryas* și *P. anubis* sînt în mare măsură determinate genetic. *P. anubis* nu formează haremuri pe cînd *P. hamadryas* formează haremuri, masculul păzind femelele ținute împreună printr-un comportament de tip „păzire”. Hibridii dintre aceste

două specii formează haremurii mai mult sau mai puțin instabile, hibridii fiind lipsiți de eficiența tehnică „păzire” pe care o posedă masculii speciei *P. hamadryas*. Nenumărate alte exemple asemănătoare pot fi desprinse urmărind diferite trăsături de comportament ale genitorilor și ale hibridilor lor interspecifici cum ar fi construirea cuibului la papagali, curțarea femelei de către mascul, comportamentul cîntecului la alte păsări sau comportamentul de contact tineret-părinți la pești.

Diferențele de comportament apar ca rezultat al evoluției. Din această cauză, datele geneticii comportamentului, după care diferențele dintre modelele de comportament specifice de specie sînt în întregime atribuite unor gene particulare nu exclud posibilitatea ca experiența socială să fie cerută pentru exprimarea genelor de comportament la un individ dat. Astfel, studiile genetice și ontogenetice în analiza trăsăturilor de comportament nu pot fi exclusive ci trebuie să se completeze reciproc.

Genetica demonstrează că genele controlează numai norma de reacție în raport cu mediul dar ea a arătat că însăși formele învățate de comportament au o bază genetică. Predispoziția de a învăța trebuie considerată ca un rezultat al evoluției.

Un progres remarcabil va fi adus în studiul comportamentului printr-o strînsă colaborare dintre genetica comportamentului și neurofiziologie.

Cel mai simplu și unul dintre cele mai bine înțelese comportamente determinate genetic este idiotia fenilpiruvică la om. Ea apare la persoanele la care lipsește, în urma unei mutații, enzima funcțională necesară pentru transformarea fenilalaninei în tirozină. Fenilalanina se acumulează în sînge și este convertită în parte în acid fenilpiruvic. Trecînd și acumulîndu-se în parte în lichidul cefalo-rahidian acești compuși afectează grav funcționarea sistemului nervos. Gena care determină fenilketonuria este o genă recesivă autozomală care în starea sa normală dirijează sinteza enzimei fenilalanin-hidrolază. Dacă se dă celor afectați o dietă lipsită de fenilalanină, ei se comportă normal, anulîndu-se deficiențele mintale, numai dacă blocajul biochimic este înlăturat la momentul oportun în timpul dezvoltării creierului.

Agresiunea umană se pare că este și ea condiționată genetic. Printre persoanele care manifestă un comportament antisocial mult mai multe față de populația obișnuită prezintă garnituri aneuploide de cromozomi și în special un cromozom

Y suplimentar, care condiționează și o talie înaltă (cel puțin 1,82 m).

Mai sînt și alte aspecte referitoare la determinismul genetic al comportamentului la animale, cum ar fi preferința pentru alcool față de apă la șoarece, comportamentul de luptă al șoarecilor, comportamentul în cîmp deschis la șoareci. Atacul șoarecilor normali asupra celor albi este foarte frecvent și totdeauna șoarecii albi sînt învinși. Avînd în vedere că la mamifere există un determinism clar al culorii blănii se admite că și comportamentul în luptă al șoarecilor care au determinism genetic diferit are un substrat ereditar.

Capacitatea de a învăța să se descurce într-un labirint s-a dovedit a fi determinată genetic la șoareci. Rapiditatea învățării este condiționată de nivelul cholinesterazei din creier, transmisia influxului nervos fiind condiționată de mediatori chimici de sinapsă precum acetilcholina. Activitatea colinesterazică înaltă influențează negativ nivelul de învățare a labirintului.

Comportamentul nu trebuie să fie înțeles a avea la bază doar o simplă relație genă-caracter. Este un aspect mult mai complex al determinismului ereditar fiind vorba de complicate interferențe genă-produs genic în care sistemul nervos central și sistemul endocrin joacă rol important.

2. DETERMINISMUL GENETIC AL INTELIGENȚEI

Prin inteligență, în lipsa unei definiții unanim acceptate am putea înțelege capacitatea de a desprinde cu rapiditate legăturile cauzale esențiale dintre fenomene, de a adapta comportamentul la circumstanțele date. Se recunosc cel puțin șase capacități distincte: capacitatea verbală (folosirea unui vocabular mai mult sau mai puțin bogat), facilitatea verbală (ușurința în asamblarea cuvintelor pentru a răspunde întrebărilor puse în cadrul testării în vederea stabilirii indicelui de inteligență), capacitatea numerică (capacitatea de a minui aritmetica de bază), capacitatea spațială (aptitudinea de a vizualiza relații spațiale în două sau trei dimensiuni), capacitatea de raționament și memoria de termen scurt și de termen lung. Deosebiri care se observă între indivizi umani pot fi manifestarea unor factori genetici sau ai mediului ambiant ori a interde-

pendenței lor; ele nu reflectă neapărat influența unică a unora sau a altora. Variația anumitor trăsături cum ar fi tipurile sanguine par a fi în întregime ereditare, ale altora cum este limba se datorează în întregime mediului, ale altora, în sfârșit, cum este statura țin și de unul și de celălalt. Adevărata problemă constă în importanța relativă a celor două componente în variația observată a unei trăsături date, la o populație dată, la un moment dat (Dobzhansky, 1966). Care este partea eredității a genomului (genomul desemnează colecția de gene în sine, pe când genotipul desemnează semnificația ereditară a acestor gene) și a mediului, a dobînditului în „fenotipul intelectual”. Există un dualism factori genetici-mediu ambiant sau *nature-nurture* (Larmat, 1977) în determinismul inteligenței.

Au existat teze ereditariste sau ineiste după care, așa cum afirma Platon: „Natura nu ne-a făcut pe noi toți la fel, ci deosebiți ca aptitudini și potriviți pentru o funcție sau alta”. Pe aceeași linie se înscrie și concepția lui Rousseau care afirma că „a voi să schimbi spiritele și să faci dintr-un prost un om talentat, înseamnă a voi ca dintr-un blond să faci un brun”. Totodată au existat și așa-numitele teze ambietaliste care refuzau orice contribuție a eredității în determinarea inteligenței. După Locke „la început spiritul este ceea ce se cheamă o „*tabula rasa*”, lipsită de orice caractere, pe care se pot înscrie semnele circumstanțelor, amprenta mediului ambiant. Pe aceeași linie, Helvetius afirma că „orice om mediocru, dacă ar fi fost mai favorizat de soartă, ar fi fost asemenea oamenilor mari al căror geniu el este silit să-l admire”.

Teza a șasea a lui Marx cu privire la Feuerbach arată că „esența umană nu este o abstracție inerentă individului izolat; în realitatea ei, ea este ansamblul relațiilor sociale, iar Ortega y Gasset afirmă că „omul nu are nici o natură; ceea ce are — sau mai curînd ceea ce este, este o istorie”. Malson afirma că „înainte de a se întîlni cu un alt om și cu grupul, omul nu este nimic altceva decît virtualități la fel de ușoare ca un abur transparent” (citată din Larmat, 1977).

Poziția cea mai acceptată în prezent este aceea a dublei determinări, cele două opinii ineistă și ambietalistă conținînd, fiecare în parte doar „o parte de adevăr”. Teza dublei determinări, genetică și ambietală a inteligenței, numără mulți partizani. Potrivit ei, fiecare copil se naște cu un genotip intelectual determinat care nu este decît unul „potențial”. Realizarea lui va depinde de mediul ambiant mai mult sau mai puțin favorabil, în sînul căruia va trăi. Astfel, unul care în altă parte ar

fi putut manifesta o inteligență superioară, va vegeta într-un mediu prea sărac din punct de vedere cultural, iar altul, mediocru înzestrat, însă beneficiind de condiții educative mai bune, își va atinge plafonul și va putea chiar, „să facă impresie“.

Inteligența poate fi testată prin stabilirea coeficientului de inteligență (C.I.) ca și prin studii ce implică anchete familiale sau gemelologia (studiul gemenilor). În populațiile umane coeficientul de inteligență are o distribuție normală de tip gaussian. Extremitățile curbei sînt ocupate de indivizi care se abat progresiv de la normă. Cei mai dotați se dispun în zona abaterilor pozitive (plus variante) avînd $C.I. = 120-140$ — reprezentînd indivizi excepționali dotați. Cei mai handicapați mintal se dispun în zona abaterilor negative (minus variante) avînd un $C.I. = 70-80$. Cei normali se dispun în zona concavă a clopotului lui Gauss, reprezentînd norma, avînd un $C.I. = 90-110$. Trecerile de la extreme la normă sînt progresive.

Pe baza analizei C.I. la copii adoptați de către părinți adoptivi s-a tras concluzia că inteligența copiilor adoptați prezintă o valoare relativă apropiată de a părinților naturali, indiciu că ea are un predominant determinism ereditar. Totodată s-a stabilit că mediul poate să-și manifeste și influența sa în dezvoltarea caracteristicilor de inteligență prin aceea că s-a demonstrat că la copii adoptați, crescuți într-un mediu social mai bun se înregistrează un coeficient de inteligență cu circa 10 puncte mai mare decît al fraților sau surorilor rămași în mediul lor inițial.

Inteligența se dovedește astfel, ca oricare alt caracter a fi exprimată la interacțiunea genotip-mediu.

Nu se cunoaște mai nimic despre genele implicate în inteligență. Se admite existența unui număr de gene majore care generează, sub forma lor mutantă, efecte patologice importante. Dar variația continuă a nivelului mintal care se exprimă prin curba gaussiană a distribuției C.I. trebuie să se bazeze pe jocul unui număr ridicat de factori ereditari, de poligene, neidentificabile individual (Larmat, 1977).

Unele forme grave de debilități mintale alături de alte simptome patologice sînt în mod clar moștenite ca dominante sau recesive, fiind aici vorba de o ereditate unifactorială transmisă de o genă simplă denumită și genă majoră căci afectează în mod grav dezvoltarea intelectuală. Se cunosc cîteva zeci de astfel de gene, multe fiind răspunzătoare de maladii metabolice cum sînt fenilcetonuria sau galactozemia.

Alte gene — favorabile, intervin în apariția geniilor. Aspectul uneori întrucîtva patologic al geniului ar fi poate în concordanță cu această ipoteză. Dar potențialul genetic intelectual, excepțional de ridicat, al geniilor — ca dealtfel potențialul anormal de coborît al multor debili, corespunde mai curînd cazurilor extreme ale unei distribuții normale a posibilităților intelectuale. O asemenea situație este conformă cu intervenția unui sistem poligenic în determinismul ereditar al inteligenței care se comportă ca un caracter cu variație cantitativă continuă în care intervin diferitele gene, fiecare avînd un efect slab (întotdeauna același pentru un factor dat) și cumulativ.

Nu există deosebiri importante între cele două sexe în ceea ce privește coeficientul de inteligență. După Anastasi (citată de Larmat, 1977) băieții apar superiori fetelor în ceea ce privește aptitudinile spațiale, raționamentul aritmetic, comprehensiunea mecanică. Fetele în schimb îi întrec în ușurința verbală și folosirea limbii, calculul numeric, capacități perceptive, memorie. Vandenberg a semnalat totuși diferențe destul de sensibile între raporturile de varianță întîlnite la gemeni, băieți și fete, ceea ce ar pleda în favoarea localizării pe cromozomul X a cîtorva din genele care controlează anumite aptitudini. Dar este posibil ca localizarea acestor gene să fie pe autozomi de vreme ce intervine mecanismul compensației de doză genetică care face ca genele X-lincate să fie în doză egală la fete și băieți.

Dar nici un model satisfăcător al genotipului intelectual nu a fost încă elaborat.

Constituția reală a genotipului intelectual trebuie să fie profund eterogenă. Nu există „gene ale inteligenței” în stare pură care să acționeze numai asupra dezvoltării unor structuri ce intervin numai în operațiile cognitive. Există mai degrabă gene care condiționează neurogeneza, ramificarea dendritelor și multiplicarea interconexiunilor lor, altele care reglează producerea enzimelor metabolismului general, altele care favorizează sau nu dezvoltarea rețelei meningeale, altele a glandelor endocrine și a secreției lor etc. Aceste gene diferă de la un individ la altul, ceea ce face ca potențialitățile intelectuale să nu fie aceleași la toți indivizii umani. Aceste gene au în cea mai mare parte efecte pleiotropice. Acțiunea lor este influențată de condițiile de nutriție și stimulii senzoriali și psihici ai mediului socio-cultural. Maturizarea cerebrală și psihică se desfășoară după ordinea și cadrul prevăzute de programul genetic dar sînt în mare măsură condiționate de exercițiul sen-

zorial și intelectual pe care îl oferă complexul socio-cultural, mai ales în primii ani de viață, care joacă un rol hotărâtor pentru viitorul intelectual al adultului.

Coeficientul de inteligență a avut un mers ascendent în istoria biologică a omului paralel cu creșterea capacității cutiei craniene însoțită însă de o mărire a potențialului de engramare. Se admite că, dat fiind faptul că în mare, evoluția biologică a omului este încheiată, coeficientul de inteligență să nu mai crească semnificativ la generațiile viitoare.*

3. ÎNVĂȚAREA ȘI MEMORIA

Învățarea reprezintă capacitatea unui sistem de a reacționa pe o cale nouă sau schimbată ca rezultat al experienței.

Memoria se referă la capacitatea de a stoca și ulterior de a regăsi și refolosi informația învățată.

Există o memorie de termen scurt și o memorie de termen lung. În memoria de termen scurt învățarea se realizează printr-o serie de încercări desfășurate într-un scurt interval de timp. Prin consolidare și fixare, memoria de termen scurt odată evocată devine prin învățăturile sale o parte a memoriei de termen lung. La baza memoriei stă proprietatea de engramare a neuronului, adică păstrarea în structura acestuia a urmelor unei informații venite din mediu.

H. Hyden a sugerat în 1960 că informația ce stă la baza engramării (urmele lăsate de informația primită de sistemul nervos) este conținută în acizii nucleici și proteinele neuronale. Lucrând pe șobolani care trebuiau să ajungă într-un cilindru spre a obține hrana, transferul șobolanilor obișnuiți să meargă pe un coridor situat pe dreapta în condițiile în care au fost obligați să folosească laba stângă și viceversa a demonstrat, după extragerea ARN din creier, din cele două zone ale sale, dreaptă și stângă, că apar diferențe semnificative în cantitatea de ARN între cele două zone. Dacă șoareci stângaci erau obligați să „capete” obișnuința de dreptaci, cantitatea de ARN din zona dreaptă a creierului era mult mai mare comparativ cu lotul martor. S-a tras concluzia că procesul de învățare, de memo-

* Există însă afirmații după care, omul actual nu traduce în realitate decât circa 10% din capacitățile sale intelectuale potențiale.

rizare este determinat de o creștere a cantității de ARN. Analizată compoziția în baze a ARN din partea dreaptă și stângă s-a dovedit a fi semnificativ diferită în conținutul C+G și A + U. Analiza compoziției în baze a ARN din neuronii corticali ai șobolanilor dreptaci nesupuși experienței de transfer a arătat că nu sînt diferențe semnificative între partea dreaptă și partea stîngă a cortexului. S-a demonstrat astfel că noul ARN format în procesul de învățare este un ARNm. La pești, după elaborarea unor noi agilități de înotat s-a constatat că apare o diferență semnificativă în raportul U/C din ARN din creier comparativ cu martorul neînvățat.

La baza memoriei stă, după cele mai acceptate ipoteze actuale, relația ARNm-proteine. Memoria de scurtă durată are la bază activitatea electrică a neuronilor implicați în engramare pe cînd în memoria de lungă durată activitatea electrică a neuronului induce de o manieră încă necunoscută formarea de ARNm care dirijează apoi sinteza de proteine implicate în stocarea memoriei de lungă durată. Nu se știe însă cum produce această proteină efectul de memorie.

La molusca *Aplysia californica*, la pești, șobolani și șoarece s-au obținut date care indică faptul că memoria și învățarea sînt intim asociate cu transcrierea de secvențe unice din ADN ca și a unor secvențe repetate.

Sinteza proteinică este cerută spre a stabili memoria de lungă durată.

Experiențele cu actinomicina D care blochează transcrierea au dovedit implicarea ARN în memorie, învățarea neobținîndu-se cînd se administrează la animale actinomicina D.

Studiul raportului bazelor azotate din ARN a arătat că într-o situație de învățare acută sînt transcrise selectiv anumite părți ale genomului spre a produce ARN specific ce corespunde unei perioade labile a memoriei de termen scurt. O a doua etapă în care se formează ARN nespecific de tip ribozomal poate constitui perioada de fixare a memoriei de termen lung. Anumite tipuri de învățare par a implica sinteza anumitor tipuri de ARN de vreme ce într-un tip de învățare se schimbă raportul A/U pe cînd într-un alt tip de învățare se schimbă raportul U/C.

Faptul că sinteza proteinică este implicată în memorie și învățare este dovedit de experiențe cu puromicină injectată în creierul animalelor (peștele auriu). Astfel puromicina injectată imediat după învățare duce la înlăturarea completă a memoriei de lungă durată. Dacă aceeași doză de puromicină este inje-

tată la o oră după ce un pește a fost învățat și a fost întors în tancul său, nu este afectată memoria de termen lung. Injecția de puromicină administrată exact înainte de încercarea de a fi învățat peștele nu are nici un efect asupra învățării. Aceasta arată că puromicina are efect numai în timpul perioadei de consolidare a memoriei de lungă durată și nu are efect asupra memoriei de scurtă durată.

Puromicina este recunoscută în mod greșit de ARN_i^{phe} în timpul sintezei proteinice și încorporarea sa în polipeptida în creștere duce la o terminare prematură a acestei catene care va fi eliminată de pe ribozom. Proteinele implicate în memoria de lungă durată sînt sintetizate numai în sistemul nervos. Rezultate similare s-au obținut cu un inhibitor al sintezei proteinice — cicloheximida. Dacă aceasta este injectată cu cîteva ore înainte de a începe experimentul de învățare, nu afectează memoria, pe cînd dacă este injectată cu 10—30 de minute înainte de experiment capacitatea de învățare este diminuată. Acest lucru arată că pentru procesul de memorizare este necesară sinteza anumitor proteine.

Capitolul XII

INGINERIE GENETICĂ

Motto 1:

...Cînd va face plopul pere
Și răchita micșunele...

Folclor românesc

Motto 2:

Chiar dacă am admite că din punct de vedere aplicativ ingineria genetică rămîne un îndepărtat izvor de făgăduinți, un prea frumos Eldorado al științei, ca cercetare fundamentală ea este o forță inestimabilă, căci în numai 5 ani a devansat cunoașterea mecanismelor eredității cu cel puțin 25 de ani.

L. Gavrilă

1. GENERALITĂȚI

Ingineria genetică numită încă inginerie genică sau manipulare de gene reprezintă un domeniu nou al științei eredității care este dedicat efectuării unor experiențe de introducere (transfer) de gene de la o specie dată într-un organism aparținînd aceleiași specii sau la altă specie de regulă foarte îndepărtată filogenetic. Prin aceasta se reorganizează materialul genetic al unui organism dat. Tot ingineriei genetice, desigur în sens larg, aparțin și experiențe legate de mutația provocată, de sinteza artificială a genei, de izolarea genelor etc. Astfel, ingineria genetică, domeniu nou al geneticii moleculare, tinde să se extindă cuprinzînd și aspecte legate de realizarea hibridilor celulari, fecundației artificiale și alofeniei (fig. 96) etc. astfel că ea se referă la manipulări de material ereditar pe care natura în mod obișnuit nu le mai realizează decît în rare cazuri, fără însă a depăși granițele de specie, lucru pe care ingineria genetică îl înfăptuiește.

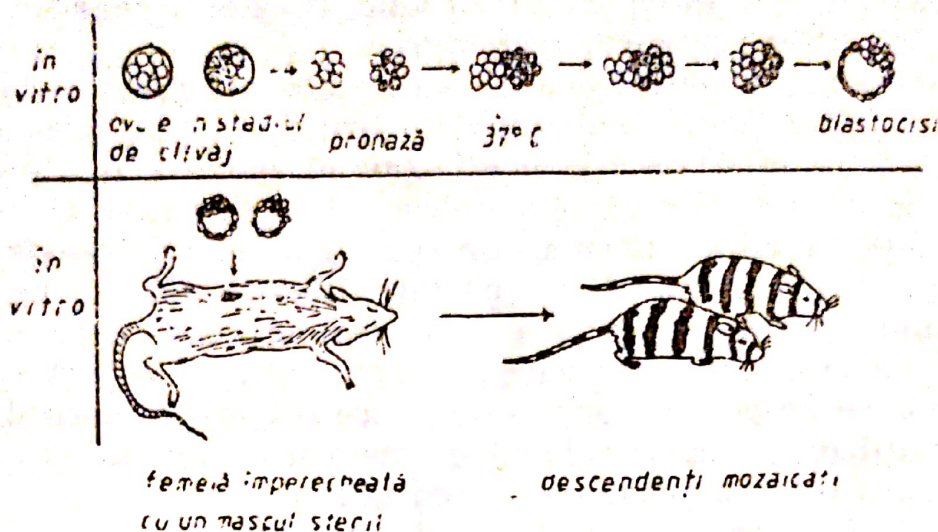


Fig. 96. Procedul pentru producerea de șoareci mozaicați (alofenici) din ovule aflate în stadii timpurii de clivaj. Membranele a două ovule diferite sînt digerate cu ajutorul *pronazei* iar apoi celulele sînt amestecate în agregate. Acestea sînt cultivate pînă în stadiul de blastocist după care sînt implantate pe cale chirurgicală într-o femelă pseudofecundată, împerecheată cu un mascul steril (vasectomizat). Dacă celule din agregat derivă din linii de șoarece diferite după culoarea blănii, descendenții prezintă un model de culoare a blănii în care alternează benzi transversale de culori diferite (după Mintz, B., 1967).

Apariția ingineriei genetice reprezintă al doilea mare salt în studiul eredității după elaborarea de către Watson și Crick a modelului de structură dublu-catenară, elicoidală a ADN. Pînă la elaborarea metodelor de inginerie genetică hibridarea a fost pe de o parte metoda de bază în analiza genetică, iar pe de alta o metodă de bază în ameliorarea plantelor și animalelor. Dar prin hibridare obișnuită pot fi încrucișate de regulă doar specii foarte înrudite, realizîndu-se o recombinare între cromozomi omologi care diferă numai printr-o serie de evenimente mutaționale. Încercările de a extinde limitele taxonomice ale hibridării au avut succese minime, datorită incompatibilității fiziologice sau sterilității descendenților obținuți (Alikhanian, 1979)*. Ingineria genetică însă a asigurat posibilitatea de hibridare între genotipuri foarte îndepărtate cum ar fi cele de procariot și eucariot, asigurîndu-se recombinarea de cromozomi neomologi respectiv transferul de gene independent de relațiile taxonomice ale organismelor implicate în acest transfer. Astfel, ingineria genetică asigură schimbul de gene

* Alikhanian, S. I. — 1979 — Achievements of Genetic Engineering and their Practical Applications. Biol. Zbl. 98: 513—526.

între specii foarte îndepărtate. Practic, ingineria genetică poate realiza hibridarea oricăror genomuri.

La baza ingineriei genice, *sensu stricto*, stă crearea de ADN hibrid sau de ADN recombinant, derivat de la două specii diferite, foarte îndepărtate filogenetic (mamifer-bacterie, de exemplu) și integrarea acestuia (clonarea) într-o celulă bacteriană unde poate funcționa normal. Se realizează astfel transferul de gene între specii foarte îndepărtate filogenetic, nu pe calea procesului sexual, ci pe baza ADN recombinant, depășindu-se astfel barierele ereditare care în mod natural separă speciile între ele. Se deschide așadar calea spre o transformare dirijată a eredității organismelor, la nivel molecular, acționându-se direct asupra bazei moleculare a eredității.

Tot de ingineria genetică țin și alte aspecte legate de modificarea aparatului ereditar, cum ar fi modificarea dirijată a structurii cromozomilor. Sînt de amintit în acest caz rezultatele obținute în 1940, de către J. G. O'Mara, care a reușit să combine caracterele a două specii prin transferul unuia sau a câtorva cromozomi de la o specie la alta. Tot astfel, Jenkins reușește, în cadrul unor hibridări intergenerice *Triticum-Secale*, să transfere în genomul hibrid alcătuit din 40—42 cromozomi de grâu cîte 2 cromozomi de secară care purtau gene responsabile pentru conferirea rezistenței la rugina galbenă și la făinare. În cadrul unui hibrid *grâu* × *pir* s-a reușit transferul unui cromozom de pir ce deținea gene care confereau rezistență la rugina neagră. S-a pus la punct tehnica de a se transfera de la o specie la alta nu cromozomi întregi ci numai segmente de cromozomi purtătoare de gene care interesează pe amelioratori. Acesta ar fi un domeniu al ingineriei genetice numit *chirurgie cromozomală*.

Dacă ar fi să privim istoric problema, primul transfer de gene a fost realizat în cadrul experiențelor lui Griffith de transformare bacteriană, efectuate în 1928 și *mutatis mutandis*, un transfer eficient de gene, de data aceasta folosind ADN purificat, a fost realizat de către Avery și colab., în 1944. Transformarea este și astăzi considerată una din căile principale prin care se realizează transferul de gene.

2. SINTEZA ARTIFICIALĂ A GENEI

Primele încercări de a sintetiza o genă la eucariote sînt ale laboratorului lui Khorana, genetician american de origine indiană.

La virusuri sinteza artificială a ADN de $\phi \times 174$ a fost realizată de către Kornberg în anul 1968, folosind un sistem acelular bacterian. ADN de $\phi \times 174$ sintetizat artificial s-a dovedit a fi înzestrat cu toate proprietățile unui ADN fagic natural, incluzând atributele de infecțiozitate.

La eucariote, mai exact la drojdie, Khorana și colab. au reușit sinteza genei care specifică ARN^t pentru alanină.

Încă din anul 1965, Holley și colab. au descifrat structura primară a acestui ARN^t^{Ala} și au stabilit că aceasta este reprezentată de o secvență lungă de 77 nucleotide. Khorana și colab. au realizat sinteza genei ce specifică acest ARN^t^{Ala} pornind de la principiul complementarității de baze azotate de tip U—A, A—T, G—C și C—G. Mai întâi au fost sintetizate pe cale chimică segmente scurte (oligonucleotide) de 10—14 nucleotide lungime, corespunzătoare unei catene și apoi pe principiul complementarității s-au sintetizat segmente complementare corespunzătoare celeilalte catene ADN. Apoi segmentele complementare se unesc cu ajutorul ADN-ligazei spre a realiza structuri bicatenare mai lungi. S-au obținut mai multe oligonucleotide. Acestea au fost legate cu ajutorul enzimei *polinucleotid-kinaza* în patru subunități majore. Din unirea acestora s-a obținut segmentul de ADN corespunzător genei pentru ARN^t^{Ala}.

Această genă, alcătuită dintr-o secvență de 77 nucleotide nu s-a dovedit a fi o genă funcțională nici *in vivo*, nici *in vitro*, deoarece era lipsită de semnalul de inițiere și de terminare a sintezei ARN^t.

În anul 1973, Khorana și colab. realizează tot prin metode chimice sinteza genei pentru ARN^t^{Tir} de *E. coli* care transferă tirozina la ribozomi. Această genă prezintă o secvență de 126 perechi de nucleotide și a reprezentat prima genă sintetizată artificial și care a fost funcțională, dat fiind faptul că a fost sintetizată totodată *secvența reglatoare* a sa.

O altă cale de sinteză artificială a genelor este calea enzimatică. Ea se bazează pe folosirea *reverstranscriptazelor* izolate din *virionii oncovirusurilor* aviare (virusul mieloblastozei aviare de exemplu) și pe izolarea de ARN^m care deține mesajul genetic copiat de pe o genă anumită. Din celule foarte specializate (eritrocite, celulele pancreatice, celulele oviductului la găină) în care are loc sinteza strictă doar a unor anumite proteine (globină, insulină, ovalbumină) este ușor de izolat ARN^m ce poartă mesajul genetic pentru aceste proteine. Apoi acest ARN^m poate fi folosit ca matriță de către o reverstranscriptază

pe el sintetizându-se o catenă ADN apoi, trecută în stare bica-
tenară, reprezintă gena pentru proteina considerată.

Reverstranscriptaza, fiind o ADN-polimerază dependentă
de ARN, necesită un *primer*. În asemenea experiențe în calitate
de primer se folosește un *oligo-dT* care se atașează la ARN_m
purificat. Desprinderea monocatenei ADN de pe matrița ARN
se realizează prin tratament cu alcalii. Trecerea monocatenei
ADN în structura bicatenară se realizează cu ajutorul unei
ADN polimeraze.

În anul 1975, echipa condusă de Arginis Efstradiates, de
la Universitatea Harvard (S.U.A) a reușit sinteza genei care
specifică hemoglobina de iepure.

În anul 1976, Hubert Köster (Germania) reușește sinteza
primei gene umane, gena pentru *angiotensina II*. Angiotensina
II este un hormon care reglează tensiunea arterială și contracția
musculaturii netede. El este alcătuit dintr-o catenă polipepti-
dică formată din numai opt aminoacizi. Gena structurală pen-
tru angiotensina II a fost sintetizată pornindu-se de la stabi-
lirea secvenței de aminoacizi a produsului său, realizându-se
apoi variantele posibile determinate de ambiguitatea și de gene-
rarea codului genetic. Dar nu s-a reușit și sinteza genei regla-
toare a acestei gene structurale.

S-a reușit de asemenea sinteza genei care specifică hormo-
nul *somatostatină*. Acesta este un hormon alcătuit dintr-o ca-
tenă polipeptidică formată din numai 14 aminoacizi și care este
produs în diferite organe precum hipotalamus, pancreas, stomac
și intestin, reglând secreția hormonului de creștere, a insulinei
și a glucagonului.

Tot astfel a fost sintetizată gena care dirijează sinteza in-
sulinei, hormon format din două catene polipeptidice, de 21,
respectiv 30 aminoacizi, derivată dintr-un precursor care are 86
aminoacizi.

3. IZOLAREA GENEI

Izolarea genei a fost realizată pentru prima dată în anul 1969,
de către J. Beckwith și colab. de la Universitatea Harvard
(S.U.A.) pe baza folosirii fenomenului de *transducție specializată*
și *sexducție F-mediată*. Prima dată a fost izolat *operonul lac*
de *E. coli*, deci un grup de gene. Genele structurale ale acestui
operon sînt desemnate *z*, *y* și *a*. Operonul mai cuprinde o *genă*

reglatoare i , precum și două regiuni denumite *promotorul* (p) și *operatorul* (o). Folosind cartarea de deleție s-a determinat că ordinea acestor gene și *situri* este următoarea: $ayzopi$. În experiență s-a folosit o tulpină bacteriană care poartă integrat în ea profagul defectiv λ numit $\lambda dgal$ și o astfel de tulpină este *lizogenă* atât pentru fagul normal λ cât și pentru fagul transductant defectiv $\lambda dgal$. Prin inducerea cu UV și lizarea celulelor ce aparțin la o asemenea tulpină bacteriană, rezultă un lizat care conține aproximativ jumătate fagi normali și jumătate particule transductante defective $\lambda dgal$. Acest tip de lizat se numește *HFT* provenind de la *high-frequency transduction* (înalță frecvență de transducție). Un asemenea lizat va fi îmbogățit în *gene gal*, ori pentru izolarea *genelor lac* trebuia să se obțină un lizat îmbogățit în *gene lac*. Nu se cunoștea însă o tulpină de *E. coli* lizogenă care să poarte un element integrat defectiv $\lambda dlac$, *genele lac* nefiind în raporturi de contiguitate cu nici un sit de atașare λ . Trebuia realizată deci o transpoziție a *genelor lac* în apropierea unui sit de atașare a profagului, fie λ (att^λ), fie a fagului înrudit $\phi 80$ ($att^{\phi 80}$), cei doi fagi λ și $\phi 80$ fiind foarte înrudiți, prezentînd hărți genetice similare, între ei putînd avea loc recombinarea genică în cadrul unor infecții mixte, inserîndu-se în cromozomul bacterian cu o aceeași orientare generală. În experiența de izolare a operonului *lac*, fagul λ a infectat sușa bacteriană *E. coli* 2710 iar fagul $\phi 80$ a infectat sușa *E. coli* 15. Această transpoziție a *genelor lac* s-a realizat cu ajutorul elementului *F*. S-a folosit o tulpină *Hfr* la care elementul *F* era integrat în apropierea operonului *lac*. Din această tulpină a derivat un *clon* la care elementul *F* s-a desprins din cromozomul bacterian antrenînd cu el și *genele lac*, devenind astfel un element F' . Prin acțiunea unui mutagen asupra celulelor F' s-a obținut un alt clon $F'_{is}{}^{lac+}$ a cărui replicare ADN este sensibilă la temperatură, putînd avea loc la 37°C dar nu și la 45°C. Acest element $F'_{is}{}^{lac+}$ nu se transmite la descendenți atîta vreme cît se află în stare autonomă și cînd cultura bacteriană se află la 45°C. El poate însă fi replicat și deci transmis la descendenți chiar dacă cultura este ținută la această temperatură, cu condiția ca să se afle în stare integrată, replicarea sa desfășurîndu-se sub controlul *repliconului* (cromozomului) principal bacterian. Astfel, trecerea culturii bacteriene cu celule mutante $F'_{is}{}^{lac+}$ de la 37°C la 45°C devine o cale sigură de selecție a celulelor *Hfr* care au integrat în cromozomul său acest element $F'_{is}{}^{lac+}$. Dacă un element *F* se poate integra în

diferite situri în cromozomul bacterian, elementul $F'_{ts} lac^+$ va manifesta preferință de împerechere cu regiunea lac a cromozomului principal. Dar interesul era ca un asemenea element F' , purtător al genelor lac să se integreze în vecinătatea unui sit de atașare a profagului. Pentru aceasta s-a folosit ca tulpină bacteriană Hfr , o tulpină care prezenta mari deleții la nivelul genelor structurale ale operonului lac , astfel încât omologia de secvență cu $F'_{ts} lac^+$ să fie foarte redusă.

Selecția tulpinilor bacteriene a dus la izolarea unei tulpini Hfr care avea $F'_{ts} lac^+$ integrat în apropierea $att^{\phi 80}$ reprezentând situl de atașare a fagului $\phi 80$ care se află adiacent genei $ton B$, care conferă sensibilitate la fagul T_1 . O astfel de bacterie este pe de o parte lac^+ (inițial prezintă regiunea lac extensiv deletată, prin integrarea lui $F'_{ts} lac^+$ devine lac^+) la temperatură înaltă și totodată rezistentă la infecția cu fagul T_1 , căci prin integrarea lui $F'_{ts} lac^+$ în apropierea genei $ton B$, această genă devine nefuncțională, anulându-se astfel sensibilitatea celulei la infecția cu fagul T_1 . Folosindu-se un mediu cu lactoză și cu fag T_1 au fost selecționate, supraviețuind doar celulele Hfr , care aveau integrat $F'_{ts} lac^+$ în cromozomul bacterian adiacent sau în cadrul genei $ton B$, asemenea celule fiind lizogenice pentru fagul $\phi 80$ și rezistente la fagul T_1 . Frecvența acestor celule era mică (1 la 10^9). Aceste celule au fost trecute pe mediu proaspăt și înmulțite. S-a realizat inducerea profagilor $\phi 80$, rezultând particule transductante ale genelor lac . Aceste particule transductante au fost folosite spre a transduce o a doua tulpină bacteriană, obținându-se un lizat HFT bogat în gene lac .

Pe o cale asemănătoare s-au izolat particule λ transductante ale genelor lac .

Beckwith și colab. au avut deci la dispoziție două tulpini bacteriene una transdusă de fagul $\phi 80$, alta transdusă de fagul λ . Fagii transductanți utilizați nu erau defectivi pentru genele fagice avînd posibilitatea de a determina plăji de liză în cultura bacteriană din care cauză au fost desemnați $\phi 80 plac$, respectiv $\lambda plac$. Astfel, s-au folosit fagii transductanți $\lambda plac 5$ și $\phi 80 plac 1$, primul purtînd genele lac în ordinea $y z o p i$ față de genele fagice A și R , atașîndu-se la dreapta operonului lac atunci cînd se integrează în cromozomul bacterian. Secvențele genelor y și i prezintă deleții iar gena a a operonului lac este cu totul absentă (fig. 97).

Fagul transductant $\lambda 80 plac 1$ poartă genele lac în ordinea $i p o z y$, atașîndu-se în stînga operonului lac atunci cînd se

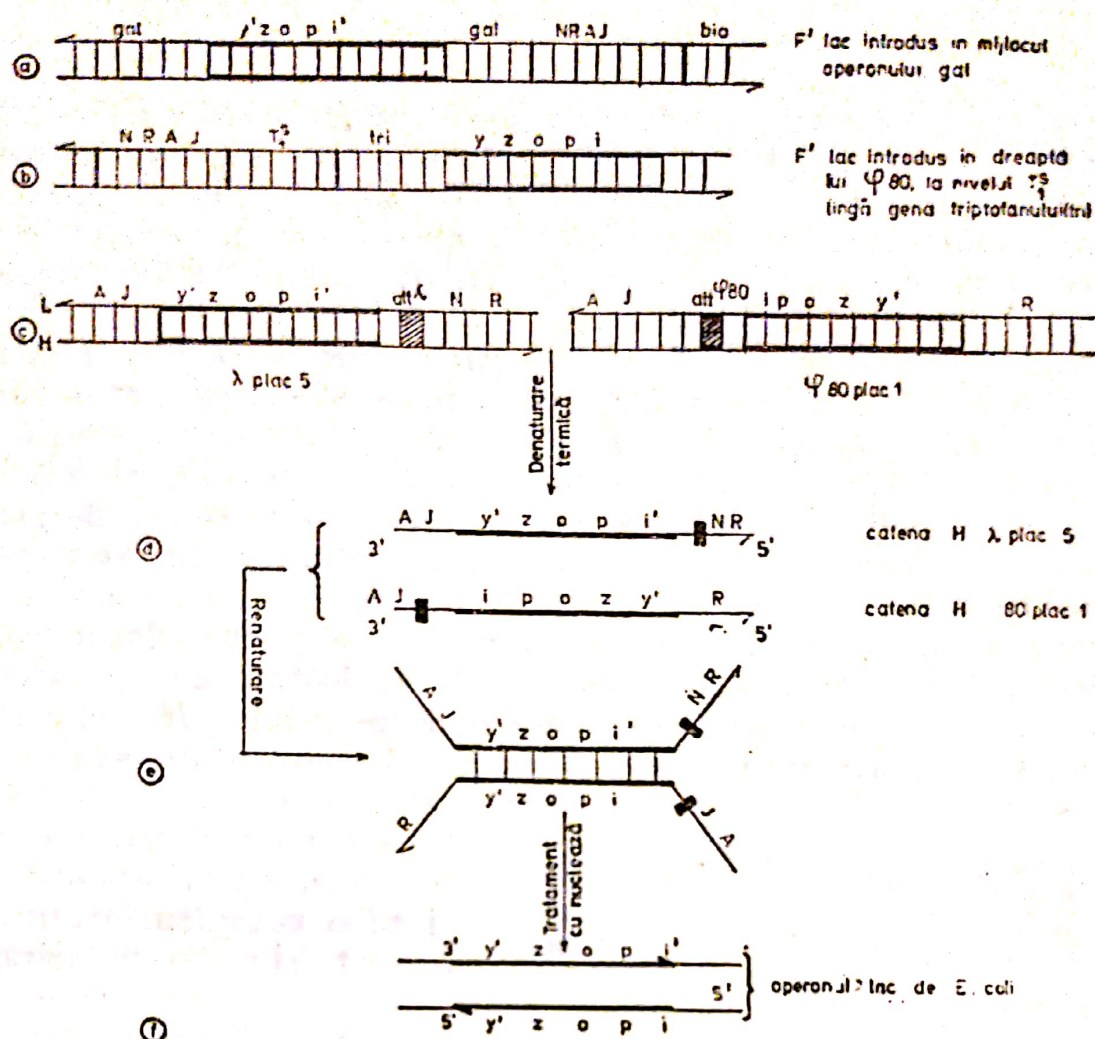


Fig. 97. Izolarea genei. (a) Introducerea *operonului lac* în apropierea fagului λ . (b) Introducerea *operonului lac* în apropierea fagului $\phi 80$. (c) Constituția genetică a fagilor transductanți λ plac 5 și $\phi 80$ plac 1. Regiunea *gal* este eliminată, folosindu-se o mutantă de *E. coli* ce are deletată această regiune. Genele *y'* și *i'* fie că prezintă deleții, fie că secvențele lor sînt separate în două părți prin integrarea episomului F'_{ts} *lac*. Genele *A*, *J*, *N* și *R* aparțin genomului fagic (*N* — genă reglatoare, *R* — genă pentru sinteza lizozimului, *A* — genă pentru sinteza proteinelor capsidei, *J* — genă pentru sinteza proteinelor cozii de atașare). Drep-tunghiurile negre reprezintă situri de atașare a fagului ($att\lambda$ și $att\phi 80$). (d) Dena-turarea ADN a fagilor transductanți duce la separarea în gradient de densitate a catenelor grele (*H*) de cele ușoare (*L*). (e). Renaturarea duce la reasocierea cate-nelor cu formare de structuri bicatenare doar la nivelul regiunii complementare ce corespunde *operonului lac*, porțiunile de ADN fagic rămînînd neasociate deoa-ree prezintă similitudine de secvență nu complementaritate. (f) Tratamentul cu *nuclează* determină hidroliza regiunilor neasociate ce corespund genomului fagic, lăsînd intactă regiunea bicatenară ce corespunde *operonului lac* (modificat după J. Shapiro și colab. 1969)

integrează în cromozomul bacterian. În acest caz doar gena *y* prezintă deleții ale secvenței sale.

Se extrage ADN de la particulele λ plac 5 și se supune denaturării. Se separă catene grele (*H*) și catene ușoare (*L*) deoarece catenele *H* fagice au un conținut mai mare de G și C, com-

parativ cu catenele *L*. Realizându-se *hibrizi moleculari ADN-ARN*, se constată că aceștia se obțin numai când se folosesc catene *L* și *ARN_m* marcat radioactiv și care poartă mesajul genelor *lac*. Aceasta înseamnă că numai catena ușoară este *catena sens* și servește ca matriță pentru sinteza *ARN_m*, catena *H* fiind catenă necodificatoare.

Când se extrage ADN de la particulele $\phi 80$ plac 1 și se supune denaturării se constată că și în acest caz se pot separa catene fagice *H* și catene *L*. La acest fag însă, *catena sens* este catena *H* și catena *L* este catena necodificatoare, ceea ce este de așteptat știut fiind că în acest caz inserția lui *F* purtător de gene *lac* a fost în sens invers inserției fagului λ transductant. Datorită înrudirii celor doi fagi λ și $\phi 80$ care se inseră în cromozomul bacterian cu o aceeași orientare generală se poate admite considerând genele fagice, că secvența de nucleotide de pe catena *H* a fagului λ este similară cu aceea de pe catena *H* a fagului $\phi 80$, și ca atare nu prezintă deloc complementaritate, sau aceasta este neglijabilă. În același timp, catenele *H* fagice, la nive-



Fig. 98. Electronografia operonului *lac*. În A se mai păstrează încă segmentele neîmperecheate ale ADN fagic la capetele operonului. În B operonul *lac* pur (după Suzuki și Griffiths 1976).

lul secvenței de baze corespunzătoare genelor *lac*, prezintă o complementaritate perfectă și cu o polaritate corespunzătoare $5' \rightarrow 3'$, respectiv $3' \rightarrow 5'$. Catenele *H* ce aparțin celor doi fagi sînt puse în soluție în vederea reasocierii (*renaturării*) realizându-se o structură bicatenară numai la nivelul secvențelor genelor *lac*, rămînînd ca niște „cozi” restul de secvențe corespunzătoare genelor fagice λ și $\phi 80$, care sînt similare și deci necomplementare. Această situație a fost confirmată și prin studii electronomicroscopice. (fig. 98).

Tratînd o asemenea structură hibridă cu nuclează specifică pentru structuri monocatenare ADN extrasă de la *Neurospora*

crassa, au fost eliminate toate secvențele fagice, rezultând un duplex ADN ce reprezintă *gene lac* pure, de circa 1,4 μ m lungime, prezentând o copie completă a *genei Z* precum și *regiunile promotoare și operatorie* ca și părți din *genele i* și *y*. Ulterior au fost izolate gene ale operonului *lac*.

Purificarea de gene a devenit posibilă odată cu punerea la punct a *hibridării moleculare ADN-ARN*. Mai întâi are loc *denaturarea* ADN prin tratament termic sau alcalin. Apoi ADN este fixat pe o bucată de hîrtie de filtru la care se adaugă o soluție de ARN în prealabil marcat radioactiv. Are loc interacțiunea ADN-ARN pe principiul complementarității, formîndu-se hibridi moleculari în care o catenă este reprezentată de ADN iar alta de ARN. ARN care nu hibridizează este înlăturat prin spălare. Apoi se măsoară radioactivitatea pe hîrtia de filtru. Cantitatea de radioactivitate arată cît de mult ARN s-a legat la ADN și deci cît din ADN are o secvență de baze complementară ARN. Acest ADN reprezintă deci gena care a fost transcrisă în ARN. Se poate astfel stabili numărul de copii ale *genei* existente în complementul ADN al fiecărei celule. Pentru izolarea unei gene pe această cale va trebui să avem la dispoziție produsul primar al transcrierii acelei gene, deci ARN corespunzător, aflat în formă pură. Genele pentru ARNr pot fi mult mai ușor izolate dat fiind faptul că ele sînt limitate la regiunile *organizator nucleolare* dar mai ales că produșii lor (diferitele tipuri de ARNr) se află în cantitate foarte mare (peste 80% din cantitatea totală de ARN celular) comparativ cu alte tipuri de ARN celular. De asemenea genele pentru ARNr care formează ceea ce se numește ADNr prezintă o compoziție în baze azotate diferite de restul ADN. Astfel, la *Xenopus laevis* ADN pentru două dintre cele trei tipuri de ARNr și anume pentru 18 S și 28 S prezintă un conținut G + C de 63% și respectiv 53%, pe cînd restul ADN are un conținut G + C de circa 40%. Folosindu-se ultracentrifugarea în gradient de densitate se poate separa ADNr de restul ADN. Cu cît mai mare este conținutul G + C cu atît mai mare este densitatea ADN. În 1967 a fost izolată prima cantitate de ADN ribozomal de la *X. laevis* de către Birnstiel și colab.

O altă metodă de izolare a genelor se bazează pe folosirea *polilizinei* — polimerul sintetic al aminoacidului *L-lizină* — care are proprietatea de a se atașa la moleculele ADN bogate în A + T, legîndu-se și antrenîndu-se astfel la fundul tubului de centrifugă. Astfel, pe această cale poate fi precipitat 99% din ADN total de *Xenopus*, lăsînd în soluție doar ADN ribozo-

mal pentru ARN 18 S și 28 S. De asemenea, pentru izolarea ADN ribozomal se pot folosi preferențial *ovocite* de amfibieni la nivelul cărora s-a desfășurat amplificarea genelor pentru ARNr. În ovocite 75% din ADN reprezintă ADN ribozomal. Porțiunile active în sinteza ARNr sînt separate de regiuni inactive — *spațatoare* — care nu sînt transcrise și care nu formează hibrizi moleculari cu ARNr. Existența de *ADN spațiator*, inactiv transcripțional a fost evidențiată de către Miller și colab. surprinzînd electronomicroscopic gena în acțiune.

4. TRANSFERUL DE GENE

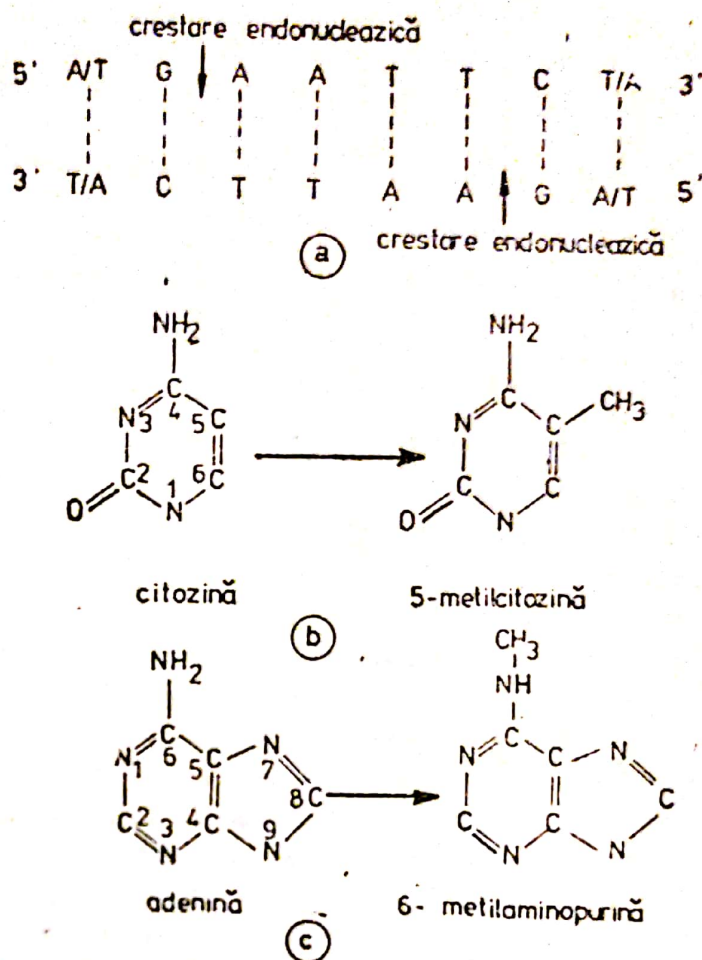
Transferul de gene se realizează în natură pe mai multe căi. La organisme superioare transferul de gene se poate realiza în procesul de fecundare sau pe *calea transducției* cu ajutorul virusurilor. La bacterii transferul natural de gene se realizează prin *transformare*, *conjugare*, *transducție* și *F-ducție*.

Transferul de gene de la organisme eucariote la bacterii, în cadrul ingineriei genetice, se face în cea mai mare parte pe baza realizării ADN recombinant sau a ADN hibrid, derivat de la două specii diferite, de regulă îndepărtate filogenetic.

Punerea la punct a tehnicii ADN recombinant s-a bazat pe o serie de descoperiri foarte importante ale geneticii moleculare, printre care *endonucleazele de restricție*, *ADN-ligazei*, *plasmidelor bacteriene* care au capacitatea de a se replica independent de cromozomul bacterian și totodată de a replica genele străine înserate în ele. Un loc important l-a avut punerea la punct a metodelor de separare a fragmentelor individuale de ADN (restricte) pe geluri de acrilamidă sau agaroză care a permis astfel izolarea de gene. Totodată, în obținerea succeselor ingineriei genetice a contribuit și o mai bună cunoaștere a particularităților fenomenelor de transformare, transducție și conjugare.

În realizarea ADN recombinant se pune mai întîi problema tăierii enzimatică a dublului helix ADN la nivelul unor situri specifice cu ajutorul *enzimelor endonucleazice de restricție* (*restrictaze*) spre a se realiza apoi *himere moleculare* (hibrizi moleculari) alcătuite din ADN ce aparține la două specii foarte îndepărtate filogenetic. Restrictazele au capacitatea de a recunoaște anumite secvențe din macromolecula de ADN, lungi de 4—8 nucleotide. Rolul *in vivo* al unor asemenea enzime este

Fig. 99. Efectele sistemului enzimatic de restricție-modificație asupra ADN a) Acțiunea unei *endonucleaze de restricție* de *E. coli* asupra ADN λ care s-a multiplicat în celule ce nu posedă un asemenea sistem enzimatic. Secvența atacată de către *endonuclează* este cu bisimetrie rotatorie (palindrom GAATTC 5'→3' pe o catenă și CTTAAG 3'→5' pe cealaltă catenă). b). și c) Acțiunea unei *metilaze* asupra citozinei și adeninei.



legat de așa-numitul sistem de *restricție-modificare* (fig. 99) prin care — cu ajutorul *restrictazelor* — este clivată orice moleculă de ADN străin celulei bacteriene, iar pe de altă parte, cu ajutorul unor enzime *modificatoare* (*metilazele* bunăoară realizează metilarea, iar *acetilazele* — acetilarea — unor baze azotate din ADN propriu) modifică propriul ADN spre a-i conferi rezistență față de atacul propriilor enzime nucleazice. Uneori însă poate fi modificat ADN străin, de exemplu cel fagic și acesta devine rezistent la *endonucleaze*.

Se cunoaște un număr mare de *restrictaze*, fiecare fiind specifică unei anumite secvențe (fig. 100). De obicei aceste secvențe reprezintă *palindroame* de tip CTTAAG XYGAATTC. De exemplu, o asemenea secvență cu *bisimetrie rotatorie* va fi recunoscută de enzima de restricție *Eco RI* care se află la *E. coli* și care are specificitate chiar pentru o asemenea secvență la nivelul căreia, acționând *endonucleolitic*, determină creșterea (clivarea) macromoleculei de ADN. Recunoscând secvența specifică, *restrictazele* determină *crestături* în catenele comple-

CITEVA DIN ENZIMELE ENDONUCLEAZE DE RESTRICTIE (RESTRICTAZE)
SI SITURILE DE RECUNOAȘTERE (după Tiollais, 1977)

ORIGINE	DENUMIREA	SITUL DE RECUNOAȘTERE	Nr siturilor de creștere în ADN		
			Lambda (50.000 perechi baze)	Adeno 2 (38.000 perechi baze)	SV 40 (15.000 perechi baze)
<i>Escherichia coli</i> RY13 purtătoare a plasmidei RTF1	EcoR I	5'-G AATTC- -CTTAA G-3'	5	5	1
<i>E. coli</i> R 245	EcoR II	- CCTGG- -GGACC	> 35	> 35	16
<i>Haemophilus</i> <i>influenzae</i> Rd	Hind II	-GTP PuAC- -CAPu PTG-	34	20	7
<i>H. influenzae</i> Rd	Hind III	-A AGCTT- -TTCGA A-	6	11	6
<i>Haemophilus</i> <i>parainfluenzae</i>	Hpa I	-GTT AAC- -CAA TTG-	11	6	4
	Hpa II	-C CGG- -GCC C-	> 50	> 50	1
<i>H. aegyptius</i>	Hae III	-GG CC- -CC GG-	> 50	> 50	18
<i>Bacillus</i> <i>amylolique-</i> <i>faciens</i> H	Bam HI	-G GATCC- -CCTAG G-	5	3	1
<i>B. globigii</i>	Bgl II	-A GATCT- -TCTAG A-	5	10	0
<i>Serratia</i> <i>marcescens</i> S	Sma I	-CC GGG- -GGG CC-	3	12	0
<i>Xanthomonas</i> <i>malvacearum</i>	Xma I	-C CCGGG- -GGGCC C-	3	12	0

Fig. 100. Cîteva din enzimele *endonucleaze de restricție (restrictaze)* și siturile de recunoaștere (după Tiollais, 1977). Unele tulpini bacteriene (*H. influenzae*) conțin mai multe activități enzimatică restrictazice. Restrictaze diferite (*Sma I* și *Xma I*) recunosc aceeași secvență dar realizează tăieturi (săgeata verticală) la diferite situri. Alte restrictaze recunosc secvențe diferite (*BamHI* și *Bgl II*) dar dau prin creștere extremități coezive identice.

mentare de ADN la nivelul unor situri separate prin cîteva nucleotide. Tăietura realizată la același sit simultan, pe ambele catene complementare ar duce la fragmentarea ireversibilă a dublului helix ADN. Endonucleazele de restricție taie ADN indiferent de informația genetică pe care o conține și adesea taie scindînd și secvența genică inactivînd această genă, rezultînd capete monocatenare care conțin deci secvențe com-

plementare (*capete coezive*) capabile de a se uni din nou prin formare de punți de hidrogen.

Alte restrictaze prezintă specificitate pentru alte secvențe din macromolecula ADN la nivelul cărora realizează creșterea, restrictazele reprezentând adevărate bisturii pentru ADN.

Gena ce urmează a fi transferată poate fi deci desprinsă din ADN speciei donatoare cu ajutorul acestor enzime restrictazice. *O altă cale* de a dispune de o genă în vederea transferului său se bazează pe sinteza chimică a acesteia. Sinteza *in vitro* a unei gene cu o secvență impusă de om urmată de clonarea sa prin tehnica ADN recombinant într-o celulă bacteriană ar putea duce la sinteza unei proteine cu totul nouă, inexistentă în natură și cu proprietăți nebanuite. În sfârșit *a treia cale* se bazează pe proprietățile fizico-chimice ale unor gene care sînt sintetizate în celule specializate în care covârșitoarea majoritate a cantității de proteine celulare are la bază aportul unei singure proteine (hemoglobina în eritrocite, fibroina în celulele glandelor sericigene, insulina în celulele pancreasului endocrin etc.). Folosind ARNm pentru aceste proteine, în sisteme acelulare poate fi sintetizată gena corespunzătoare într-un sistem de reverstranscriere. *A patra cale* este izolarea chimică bazată pe folosirea *factorilor proteinici* (ARN-polimeraza dependentă de ADN, represori, proteine specifice) capabili de a recunoaște specific anumite secvențe de nucleotide la care se atașează și astfel protejează ADN ce corespunde unei gene date față de digestia enzimatică cu DN-ază.

O a doua problemă pe care o ridică realizarea transferului de gene este găsirea unui vector adecvat, a unui cărauș care să transporte un segment de ADN ce corespunde unei gene sau mai multor gene într-o celulă gazdă și care să fie capabil de a se replica el însuși și totodată să dirijeze replicarea segmentului de ADN unit la el. Cele mai adecvate structuri moleculare capabile de a îndeplini un asemenea rol sînt *plasmidele bacteriene*, care s-au dovedit a juca rolul unui „cal troian” ce poate transporta în celula bacteriană gene de la eucariote de exemplu. Reamintim că ele reprezintă în esență *repliconi*, avînd capacitatea de a se replica autonom în celula bacteriană.

Transferul de ADN *plasmidial* de la un organism la altul în cadrul grupului *Enterobacteriaceelor* se realizează de obicei prin *conjugare* sau *transducție*. S-a arătat însă că în urma tratamentului cu clorură de calciu pătrunderea ADN exogen în cadrul unor experiențe de transformare este mult ușurată,

făcînd astfel posibilă includerea într-o celulă și a unei molecule circulare de ADN plasmidial.

Realizarea de ADN recombinant prin unirea unui fragment de ADN de la o specie cu un ADN plasmidial se bazează pe acțiunea restrictazelor asupra ADN eucariot și asupra ADN plasmidial. Plasmidele conțin un număr limitat de gene, legate mai ales de rezistența la antibiotice. Sub acțiunea *restrictazei*, molecula circulară a plasmidei este desfăcută și transformată în moleculă liniară. Se realizează apoi unirea ADN eucariot cu molecula liniară de ADN plasmidial cu ajutorul enzimei ADN ligază, obținîndu-se un ADN recombinant, numit *himeră moleculară* sau *plasmidă recombinantă* (fig. 101). Unirea capetelor fragmentului de ADN ce urmează a fi transferat cu capetele moleculei liniare de ADN plasmidial se realizează numai dacă acestea prezintă secvențe complementare de baze, adică sînt

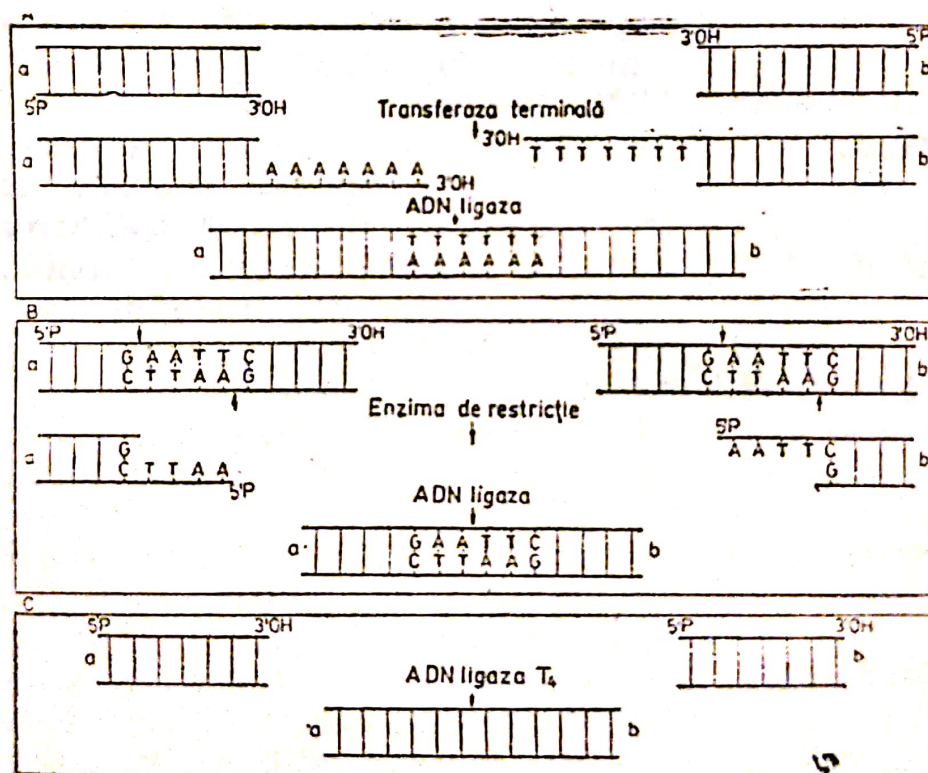


Fig. 101. — Trei căi prin care se poate construi un ADN recombinant; *a* și *b* reprezintă două molecule de ADN ce provin de la două specii diferite. (A) — Enzima *terminal transferază* atașează la capetele 3'—OH ale celor două molecule secvențe monocatenare complementare care se unesc; *ADN ligaza* asigurînd formarea unei legături covalente. (B) — *Restrictaza* duce la formarea de extremități coezive la capetele celor două molecule *a* și *b* de ADN. Aceste extremități se unesc pe principiul complementarității iar *ADN ligaza* le leagă covalent. (C.) Utilizînd *ADN ligaza* de *T₄* se poate realiza unirea directă a două molecule de ADN care nu au extremități coezive (după Tiollais, 1977).

coezi („lipicioase“). Este însă greu de întâlnit asemenea situații în care orice fragment de ADN să prezinte complementaritate la nivelul secvenței sale terminale cu secvența de baze de la capetele vectorului. O asemenea dificultate este învinsă prin folosirea unei enzime speciale numită *polinucleotidil-terminal-transferaza* care, fără a fi dependentă de o matriță ADN, catalizează polimerizarea unor nucleotide la capetele unor structuri bicatenare de ADN. Astfel, în sisteme aceluare adecvate, sub cataliza unei asemenea enzime se poate adăuga la capetele unui fragment de ADN poliadenilatul (*poli-d A*) iar la capetele vectorului politimidilatul (*poli-d T*). După o asemenea prelungire a celor două molecule cu așa-numitele „cozi“ monocatenare complementare, poate avea loc ușor o unire a lor spre a da o structură circulară reprezentând un ADN recombinant sau mai exact o plasmidă recombinantă care pe lângă genele sale poartă și o genă sau mai multe de la un organism ce aparține unei specii foarte îndepărtată filogenetic (mamifer de exemplu) separate de milioane sau miliarde de ani prin bariere genetice dar acum se regăsesc într-o aceeași moleculă de ADN recombinant. O asemenea plasmidă recombinantă poate fi transferată într-o celulă bacteriană gazdă, care în prealabil a suferit o modificare a permeabilității de membrană în urma tratamentului cu clorură de calciu.

După realizarea ADN recombinant trebuie rezolvate următoarele probleme (Alikhanian, 1979):

- elaborarea de metode spre a obține expresia completă a genelor transferate;
 - stabilizarea moleculelor hibride în celulele gazdă străine;
 - asigurarea amplificării acestor molecule hibride;
 - integrarea genei străine într-un nou cromozom gazdă
- căci încadrată în plasmidele autonome prezintă o oarecare instabilitate pe care o manifestă și cărașul lor însuși — *plasmida*.

Celula bacteriană receptoare a ADN recombinant trebuie să îndeplinească o condiție și anume să fie deficientă în sistemul de restricție pentru a nu ataca ADN recombinant exogen. În noua sa gazdă plasmida hibridă se replică, replicându-se totodată și gena inclusă în ea, care poate funcționa normal în noile condiții dirijând sinteza unor produși specifici, folosind aparatul de sinteză proteinică al celulei bacteriene. În sfârșit, o a treia cerință în realizarea transferului de gene este punerea la punct a unei metode prin care să se detecteze dacă celulele receptoare conțin molecula de ADN recombinant. Faptul

că plasmidele conțin gene ale rezistenței la antibiotice, constituie un marker potrivit pentru aprecierea pătrunderii unei asemenea plasmide recombinante într-o celulă bacteriană gazdă care nu prezintă rezistență la antibioticul considerat.*

Existența genei eucariote în celula bacteriană poate fi deci apreciată fie autoradiografic, fie prin izolarea și caracterizarea produsului său genic.

Primele rezultate în obținerea de plasmide recombinante sînt cele ale lui S. N. Cohen și colab. de la Școala de medicină a Universității Stanford. La început ei au cuplat gene ce specifică rezistența la penicilină la *Staphylococcus aureus* cu plasmide de *E. coli* și le-au introdus în *E. coli* unde ele s-au replicat și au funcționat normal. Tot pe această cale au fost transferate la *E. coli* gene ribozomale de la *Xenopus laevis* și de la *Drosophila*, gene care au funcționat normal producînd în celula bacteriană molecule de ARNr specific eucariote. De asemenea, pe această cale au fost transferate gene care specifică histone de la batracieni. Prima secvență genică de la mamifere inserată într-o plasmidă a fost aceea care specifică sinteza hemoglobinei de la iepure.

Plasmida recombinantă poate conține gena pentru insulină, sau gena pentru hemoglobină, pentru angiotensina II sau gena pentru somatostatina etc.

Prin diviziunea celulei ce are în ea plasmida recombinantă rezultă o clonă de celule ce pot fi selecționate pe mediu selectiv, folosindu-se rezistența la antibiotice (tetraciclină, penicilină, cloramfenicol, streptomycină etc.) a plasmidei recombinante. Cum ritmul de diviziune al celulei bacteriene este mult mai intens comparativ cu celula eucariotă, înseamnă că gena eucariotă din celula bacteriană se replică mult mai intens, oferind mai multe matrițe pentru sinteza unui ARNm specific. În final rezultă o cantitate mult mai mare de produs genic care poate avea deosebită importanță din punct de vedere medical sau zootehnic.

Dintre realizările recente ale ingineriei genetice merită a fi menționată includerea într-un plasmid bacterian a genelor care dirijează sinteza ARNr de la *X. laevis* sau a celor care dirijează sinteza histonelor de la ariciul de mare ca și a unor gene mitocondriale de la șoarece. De asemenea, au fost introduse în plasmidul bacterian genele care intervin în sinteza hemo-

* Recent au fost puse la punct metode de detectare autoradiografică rapidă a includerii genei eucariote în cromozomul bacterian (sonde autoradiografice)

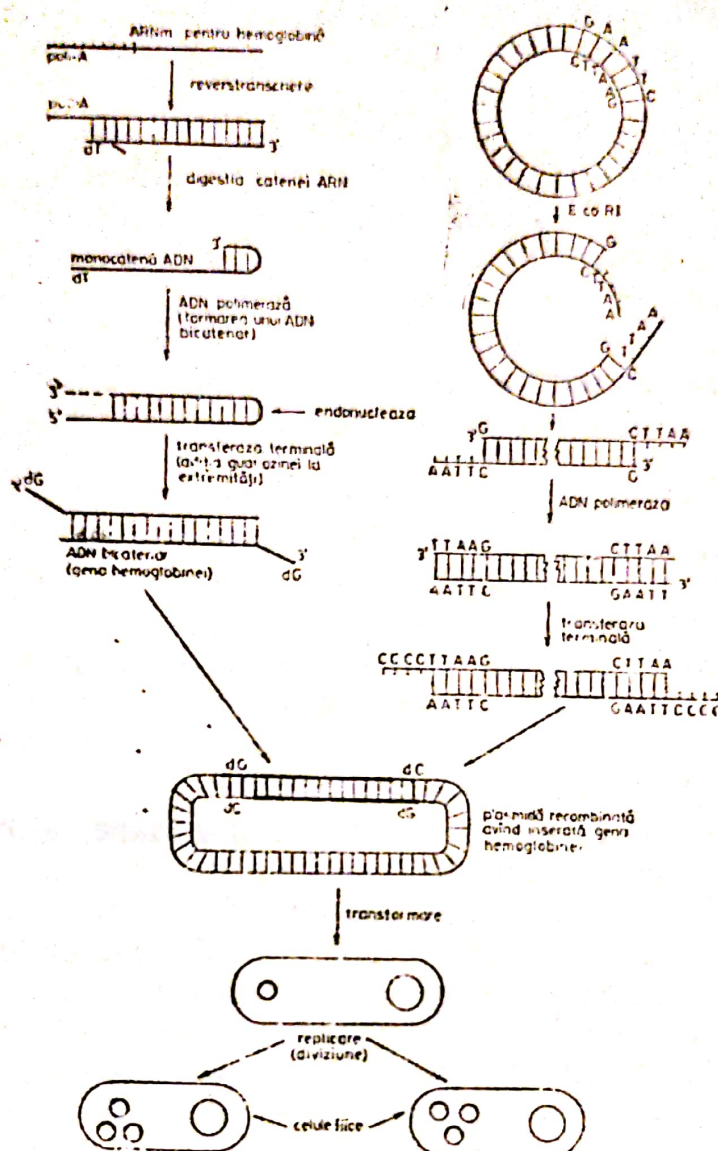


Fig. 102. Clonarea genei pentru hemoglobina de iepure în bacteria *E. coli* (modificat după Lambert, 1976).

globinei la iepure (fig. 102). Intrate în celula bacteriană, aceste gene eucariote s-au dovedit a funcționa normal, fără însă a se stabili dacă produșii genici sintetizați sînt sau nu funcționali.

În afară de eventualele avantaje pe care transferul de gene îl prezintă din punct de vedere practic, transferul de gene eucariote în celula bacteriană poate ajuta la elucidarea organizării și funcționării unor asemenea gene. Astfel, prin clonarea (introducerea unei gene de eucariot în celula bacteriană și nașterea unei clone celulare bacteriene purtătoare a unei asemenea gene) genei pentru ARNr de *X. laevis* la *E. coli* D. Brown a sta-

bilit că această genă este prezentă în 20 000 de copii identice, separate de regiuni necodificatoare — spațatoare — care au aceeași lungime.

În anul 1971, Dixon și Postgate de la Universitatea Sussex din Anglia au realizat transferul intraspecific al genei* care intervine în fixarea azotului numită *gena nitrogenazei (nif)* lucrând pe bacteria *Klebsiella pneumoniae*. Totodată ei au reușit transferul genei *nif* de la *K.pneumoniae* la *E.coli*. Gena *nif* este strâns lincată cu gena care dirijează sinteza histidinei (*his*) și ușurează astfel urmărirea transferului său, la forme auxotrofe *his*⁻. Dar în cazul transferului genei *nif* cel mai sigur test este cel al reducerii acetilenei în etilenă prin care se demonstrează eficiența transferului genei *nif* și respectiv al activității genei *nif* care fixează azotul molecular. Totodată transferul genelor *nif* și *his* este adesea însoțit de transferul unui factor *R* de rezistență la antibiotice.

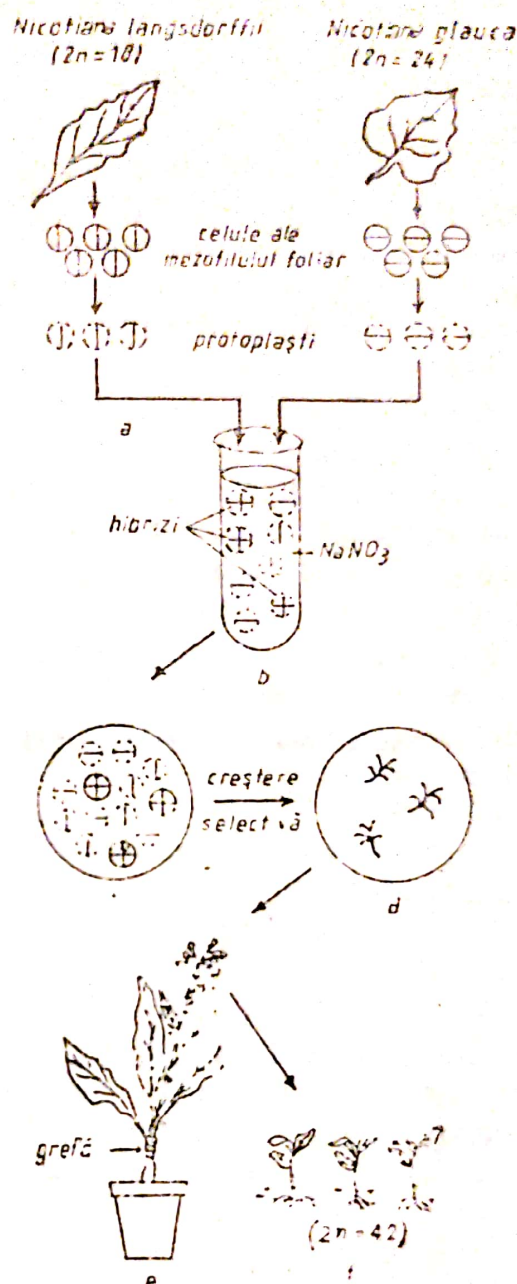
Transferului genei *nif* i se acordă o atenție deosebită considerându-se că ar putea ajuta la elucidarea circuitului azotului ca și la crearea unor mase plastice pe bază de azot care apoi s-ar transforma în îngrășăminte azotoase.**

Transferul genei *nif* la plantele superioare, altele decât leguminoasele (care în mod obișnuit realizează la nivelul nodozităților simbioze cu bacterii fixatoare de azot) ar aduce nebanuite beneficii agriculturii. Transferul de plasmide bacteriene recombinante, purtătoare ale genelor *nif* este teoretic posibil. S-au pus la punct tehnici de obținere a unor celule *nude (protoplaști)* lipsite de membrana celulară, în urma unui tratament enzimatic adecvat ca pectinaze și celuloaze din care se speră că ar putea deriva plante întregi. Chiar și obținerea de protoplaști reprezintă un succes al ingineriei genetice, întrucât prin tratamente speciale ale acestora cu polietilen alisol se poate realiza fuziunea de protoplaste (fig. 103). aparținând nu numai la specii sau genuri diferite, dar chiar și fuziune de protoplaști vegetali cu celule animale, realizându-se bunăoară hibrizi celulari *om-morcov*, hibrizi care au suferit diviziuni ulterioare ordonate.

* Este vorba de fapt de un complex de gene în care intră circa 15 unități.

** La noi în țară, încă din anul 1977, la inițiativa profesorului G. Zarnea, cu sprijinul C.N.S.T. activează în cadrul Institutului de Biologie București un colectiv de inginerie genetică bacteriană, care are ca prim obiectiv crearea de noi bacterii fixatoare de azot.

Fig. 103. Diagrama tehnicii de hibridare a celulelor somatice prin care se obțin alopoliplizi de *Nicotiana* pe cale parasexuală. a) Tratarea celulelor foliare prelevate de la două specii genitoare de *Nicotiana* cu enzime care digeră pereții celulari (celulaze, pectinaze) obținându-se celule nude sau protoplaști. b) Plasarea protoplaștilor în soluție de azotat de sodiu care facilitează fuziunea de celule spre a se obține hibrizi celulari alopoliplizi. c) După centrifugare, celulele sînt trecute pe un mediu selectiv care permite doar creșterea celulelor hibride. d) Celulele hibride se multiplică și dau tulpinițe și frunze care sînt altoite (e) pe unul dintre genitori. Planta hibridă altoită va produce flori fertile care vor face semințe care prin germinare vor da plantule și apoi plante alopoliplioide complet mature (după Smith. H.H., 1974).



La plante pe calea fuziunii de protoplaste s-au realizat hibrizi parasexuali, cum ar fi hibrizii interspecifici la *Nicotiana*, *Daucus*, *Datura* și *Petunia* precum și hibrizi intergenerici dintre cartof și tomate (pomato) apoi între *Datura innoxia* și *Atropa belladonna* sau *Arabidopsis* și *Brassica*. La hibrizi s-au remarcat noi combinații de mitocondri sau predominarea unuia dintre tipurile de cloroplaste (Bindina și Nehls, 1979) ca și eliminarea preferențială a cromozomilor de *Nicotiana glauca* din hibridul soia + tutun.

Revenind la transferul genelor *nif*, succesul unui astfel de transfer la plantele de cultură, neleguminoase, cum ar fi cerealele, ar reduce cheltuielile cerute de industria costisitoare a îngrășămintelor chimice azotate și totodată și poluarea. Efectuarea unui transfer de gene *nif* de la *Rhizobium* la plantele de cultură este teoretic posibilă dat fiind faptul că s-a constatat funcționarea genelor *nif* nu numai în condiții de atmosferă lipsită de oxigen cum se credea până nu de mult, atmosferă realizată doar de structura unor nodozități, ci și în atmosferă cu oxigen, *Rhizobium* fixând azotul și în stare liberă, adică în afara simbiozei. În prezent însă este irealizabil transferul genelor *nif* în celula eucariotă vegetală, căci fixarea azotului — activitatea complexului *nitrogenazei* — cere condiții de *hipoxie* sau chiar *anaerobe* și mari cantități de energie și de ATP, condiții pe care nu le îndeplinește nici o celulă vegetală eucariotă.

5. TRANSFERUL DE GENE ÎN CELULA EUCARIOTĂ

Folosind ADN marcat radioactiv izolat de la bacterii precum *E.coli*, *B.subtilis*, *Micrococcus lysodeikticus* s-a reușit transferul său în celulele plantelor tinere de orz prin așa-numitele experiențe de *captare*. Integrarea ADN bacterian în ADN al celulei eucariote se realizează prin fenomene de *recombinare*.

În anul 1971 C. Merrill a reușit transferul complexului de gene care intervin în metabolizarea galactozei (*operonul gal*) transformînd-o în glucoză, de la *E.coli* în celulele umane aflate în cultură, cu ajutorul bacteriofagului *R*. S-a folosit un fragment de piele prelevat de la un copil bolnav de o boală moleculară foarte gravă — *galactozemia*. Boala se manifestă clinic prin *retardație mintală*, determinată de acumularea galactozei în celule, în absența funcționării genelor normale care dirijează sinteza enzimelor (în speță *galactozo-1-fosfat-uridil-transferaza*) ce transformă galactoză în glucoză, aceasta din urmă fiind asimilabilă.

Fragmentul de piele a fost pus într-un mediu de cultură adecvat. Cultura a fost infectată cu fagul *R*, transductant al *operonului galactoză* care se integrează în cromozomul bacterian între *operonul gal* și *operonul biotină (bio)* transducînd *operonul gal*. Celulele umane au început să metabolizeze galactoză, ceea ce denotă integrarea *operonului gal* în genomul uman.

Iată deci o tară ereditară umană care poate fi înlăturată, deocamdată în culturi celulare, prin transferul genei normale de la o bacterie, prin intermediul unui virus.

Transferul de gene de la bacterie la celula eucariotă se numește *transgenoză* — termen care arată că nu se cunoaște încă starea adevărată a genelor bacteriene transferate în celulele eucariote. În unele experiențe s-a folosit ADN modificat al virusului SV-40 ca vector pentru transferul de gene animale în culturi de celule. Genomul SV-40 este o moleculă circulară mică care seamănă în unele privințe cu plasmidele bacteriene.

La plantele inferioare ca vector al genelor plantelor superioare poate fi folosit ADN dublu-catenar al virusului *Caulimovirus*. Cea mai utilă în transferul genelor la plantele superioare apare a fi *plasmida Ti* de *Agrobacterium tumefaciens* care stă la baza malignizării celulelor plantelor. Celulele transformate produc doi aminoacizi neobișnuiți *octopina* și *nopalina* derivați ai argininei, care nu se găsesc în celulele vegetale normale. Enzimele ce sintetizează acești compuși sînt codificate de ADN plasmidial. *Agrobacterium* este adaptat să utilizeze acești aminoacizi. Acesta este un caz de *colonizare genetică* a celulelor plantelor superioare de către bacterii, apărut în evoluție.

Se crede că ingineria genetică poate să ajute la corectarea unor tare ereditare la om. Dificultățile tehnice prezente sînt enorme. Dar teoretic, transferul de gene nu este imposibil. El poate fi realizat fie direct, cu ajutorul cromozomilor înșiși (există date după care celulele umane *HeLa* aflate în culturi pot capta cromozomi metafazici al căror ADN pătrunde eventual în nucleul celulei gazdă, unde se replică și funcționează ca matriță pentru sinteza ARNm), fie indirect cu ajutorul virusurilor.

Willecke și Ruddle (1974) pe de o parte și Wesley și McBride, pe de alta (1975) au remarcat captarea de cromozomi în culturi mixte de celule șoarece-hamster. Celulele de șoarece prezentau mutația unei gene care dirija sinteza unei enzime. Cultivate împreună cu celulele de hamster s-a observat că celulele de șoarece se pot dezvolta normal, se divid, încorporînd cromozomul purtător al genei care dirijează sinteza normală a enzimei (*hipoxantin-fosforibozil-transferază*). Aceleași celule deficiente de șoarece pot încorpora un fragment de cromozom uman, care însă ulterior se pierde. La *Neurospora crassa* s-a constatat că poate avea loc corectarea unor defecte ereditare nu prin încorporare de ADN ci prin încorporare de ARN. Acest

fapt oferă speranța că și unele maladii genetice umane pot fi eventual corectate prin administrare de ARN.

Celulele au totodată proprietatea de a elimina ADN în afara lor, ADN care însoțit de un aparat enzimatic corespunzător, își desfășoară funcțiile sale normale. Acest ADN numit încă *ADN metabolic*, reprezintă copii suplimentare ale unora dintre gene (acest fapt se remarcă în mod normal în ovogeneza amfibienilor, când extracopii ale genelor ribozomale se desprind de pe cromozom sub forma unor nucleoli extracromozomiali, care pot ieși și în citoplasmă unde și replică ADN_r). Dacă fenomenul de metastază se bazează pe existența unui asemenea ADN „voiajor” oamenii de știință își pun problema cum ar putea fi distrus înainte de a ajunge la țintă. Asemenea ADN *exogen* remarcat de către A. Fox care nu se integrează într-un cromozom s-a numit *exozom*. El se replică independent, fiind comparabil cu plasmidele bacteriene. Descriș la drosofilă, nu este exclus să se afle și la mamifere și inclusiv la om.

Existența exozomilor ar constitui un punct de sprijin în elaborarea unor tehnici privind transferul direct de ADN în celula umană.

Sînt multe controverse privind implicațiile ingineriei genetice. Ele pot fi pozitive, legate de obținerea unor produși farmaceutici mai eficienți și mai ieftini, o mai bună cunoaștere a cauzelor malignizării celulare, obținerea unor rezerve de hrană mai abundente, găsirea unor noi surse de energie etc. Pe de altă parte apare și reversul, implicațiile negative nefiind de nesocotit. ADN recombinant în care sînt implicate gene ale oncovirusurilor, ca și unele gene de bacterii (rezistența la antibiotice) sau chiar animale, poate sta la baza unor eventuale epidemii mondiale cauzate de patogenii nou creați, accentuării dezechilibrelor ecologice catastrofale, apariția de noi arme biologice pentru militariști și teroriști etc.

Aplicațiile practice ale ingineriei genetice implică:

- modificarea genetică a microorganismelor industriale spre a crește productivitatea lor;
- combinarea într-o singură celulă a sintezei a doi sau mai mulți produși diferiți;
- introducerea în celule de gene care n-au existat niciodată acolo (gene de animale în bacterii) cu scopul de a realiza sinteze de proteine specifice, hormoni, anticorpi;
- modificarea genetică a speciilor de plante superioare cu scopul de a ridica capacitatea lor de producție;

— transferul genelor care codifică metaboliți folositori sau proteine de la unele procariote la altele spre a simplifica producerea lor și a le face mai ieftine;

— transformarea genetică a celulelor somatice umane spre a corecta defectele genetice.

Folosind plasmide care controlează căile biosintetice ale antibioticelor structural asemănătoare s-ar putea realiza antibiotice hibride cu un spectru mai larg de acțiune. De asemenea producerea de vaccinuri antivirale împotriva unor boli precum influenza, poliomielita, hepatita, mononucleoza infecțioasă sau a interferonului se poate realiza cu ajutorul ingineriei genetice. Fragmentele de ADN ce codifică proteinele capsidei virale pot fi identificate, izolate și inserate în plasmide, iar transferul lor în celulele bacteriene ar asigura fabricarea de proteine ale capsidei folosite în fabricarea vaccinurilor.

Tot astfel s-ar putea produce variatele tipuri de imunoglobulină umană, interferon, insulină, hormoni de creștere etc. Sinteza unor asemenea substanțe în celula animală este strict reglată și deci realizată în limite foarte mici. Cultivarea microorganismelor obținute cu ajutorul ingineriei genetice și care conțin gene specifice de la celula animală în containere speciale ar facilita sinteza acestor produși la scară industrială.

Producerea de proteine pe medii ieftine precum hidrocarburi din petrol este un obiectiv important al microbiologiei industriale. Genele care codifică enzimele ce intervin în degradarea hidrocarburilor nu sînt localizate pe cromozomul bacterian de *Pseudomonas*, de exemplu, ci pe plasmidele altei bacterii. Dar trebuie luate măsuri suplimentare în folosirea produșilor proteinici obținuți cu ajutorul microorganismelor (bacterii, drojdii) căci petrolul brut conține diferite tipuri de hidrocarburi, unele rămînînd neschimbate în timpul creșterii drojdiilor. Multe hidrocarburi aromatice policiclice sînt potențiali carcinogeni și ele trebuie îndepărtate din petrol sau din drojdii care cresc pe petrol, ceea ce face ca produsul proteinic să fie mult mai costisitor. Dar, pentru utilizarea completă a petrolului s-a sugerat folosirea unui amestec de tulpini de bacterii ce poartă variate plasmide ale căror gene dirijează sinteza de enzime ce intervin în degradarea diferitelor hidrocarburi. Dar metoda nu a dat rezultatele așteptate. S-a reușit transferul de diverse plasmide într-o singură tulpină bacteriană, realizîndu-se o variantă multi-plasmidică de *Pseudomonas putida*. Aceasta utilizează efectiv toate componentele petrolului brut. Rezultate asemănătoare s-au obținut în folosirea deșeurilor celulozice și

în producerea de metan. Organismele producătoare de metan sînt greu de cultivat. Prin introducerea de gene ale sintezei metanului de la microorganismele sintetizatoare ale metanului în alte forme anaerobocelulolitice, s-a determinat o conversie rapidă și directă a deșeurilor de celuloză în metan.

Construirea serotipului 5 al bacteriei *Bacillus thuringiensis* var. *galleria* prin inginerie genetică are o serie de mari aplicații practice. Toxina sintetizată de această variantă bacteriană are acțiune insecticidă cu un spectru larg, dar varianta este sensibilă la fag. Trecerea genei toxinei într-o tulpină rezistentă la fag ar fi un succes deosebit al ingineriei genetice.

În prezent, ingineria genetică ar fi singura cale posibilă de a trata bolile ereditare la om, legate mai ales de defecte în genele ce dirijează sinteza unor enzime. Genele normale extrase pe căi diferite ar putea fi introduse în fragmente ale virusului SV-40 și aceste fragmente ar putea fi introduse în celulele fetale sau ale măduvei roșii restabilindu-se astfel funcția enzimatică normală a organismului bolnav. Dar o asemenea intervenție implică anumite riscuri și ea trebuie precedată de o examinare atentă și soluționarea problemelor legale și etice.

Cercetările lui Seeburg și a colaboratorilor, ca și ale lui Itakura și colaboratorilor săi, referitoare la clonarea genei insulinei și a genei somatostatinei au avut la bază izolarea unui fragment de ADN ce poartă secvența ce codifică insulina pe calea sintezei unui ADN complementar monocatenar pe matrița de ARNm pentru aceste proteine, într-un sistem de reverstranscriere. ADN monocatenar complementar, printr-o serie de manipulări chimice a fost convertit în ADN liniar dublu-catenar și la capetele sale s-au atașat secvențe de ADN ce reprezintă situl de recunoaștere pentru o endonuclează de restricție specifică. După tratarea cu endonucleaza de restricție s-a realizat legarea la un vector cu ajutorul unei ADN-ligaze.

Analiza directă a secvențelor nucleotidice ale fragmentelor izolate, clonate și amplificate pe vectori plasmidiali pMBS și pBR 322 a arătat că într-adevăr gena insulinei ca și cea a somatostatinei au fost clonate în celula bacteriană. Gena insulinei a fost transcrisă dar nu și tradusă (Alikhanian, 1979). Itakura și colaboratorii au clonat gena somatostatinei. Somatostatina este o polipeptidă foarte mică, alcătuită din 14 aminoacizi. Este hormon de creștere. Gena somatostatinei a fost sintetizată chimic și clonată pe plasmidul pBR 322. Un fragment al operonului lac de la *E.coli* care controlează expresia operonului a fost atașat la acest plasmid și gena somatostatinei. Introdu-

cerea fragmentului reglator este necesară pentru a se realiza transcrierea genei somatostatinei. Dar celulele care au molecula hibridă nu au produs somatostatina. Inserîndu-se gena structurală pentru β -galactozidază între fragmentul operator-reglator *lac* și gena somatostatinei, s-a reușit sinteza somatostatinei în celulele de *E.coli*, prezența somatostatinei fiind demonstrată prin analiza radioimună. Cînd gena β -galactozidazei a fost inserată în direcție inversă, nu a avut loc transcrierea și traducerea genei somatostatinei. Expresia genei somatostatinei a fost amplificată atunci cînd s-a folosit în mediul de cultură pentru *E.coli* inductorul operonului *lac*, adică lactoza. Somatostatina obținută cu ajutorul ingineriei genetice a fost comparată cromatografic cu cea naturală. S-a dovedit identitatea absolută structurală a celor două tipuri de somatostatina. Dar producția de somatostatina a fost foarte redusă (1/10 din nivelul așteptat), pare-se datorită instabilității moleculei hibride. Recent cercetătorii de la Universitatea din Zürich și de la Biogen S.A. din Geneva au realizat clonarea genelor pentru producerea interferonului uman în *E.coli*. Bacteria a produs cantități semnificative de interferon. Rămîn încă unele aspecte de ordin speculativ în domeniul implicațiilor practice ale ingineriei genetice.

- DOBZHANSKY, TH. — 1970 — Genetics of the Evolutionary Process. New York. Columbia University Press.
- DUPRAW, E. J. — 1970 — DNA and Chromosomes. New York Holt, Rinehart and Winston.
- FINCHAM, J. R. S. — 1973 — Using Fungi to Study Genetic Recombination. Oxford Biol. Redd. Oxford Univ. Press, 1—16.
- FRAENKEL—CONRAT. H. & B. SINGER — 1957 — Virus Reconstitution: Combination of Protein and Nucleic Acid from Different Strains. Biochim, Biophys. Acta. 24 : 540—548.
- GAVRILĂ, L. — 1976 — Trepte în cucerirea genei. Natura. 2 (XXVII) 29—37.
- GAVRILĂ, L. — 1977 — Ereditatea și variabilitatea (în: M. Tufescu, L. Gavrilă, V. Soran, N. Cîmpeanu — Lucrări practice de biologie generală) Ed. Did. și Ped. București.
- GAVRILĂ, L. — 1978 — Genetica algelor. Ed. Academiei R. S. R. București.
- GAVRILĂ, L., MIHĂESCU, GR. — 1981 — Mutageneză și cartare genică temporară la cianobacteriile *Synechococcus* și *Nostoc*. Al treilea Simpozion Național de Genetică. Piatra-Neamț, 29—30 mai.
- GAVRILĂ, L., MIHĂESCU, GR. — 1981 — Amplificarea genelor ribozomale. Studiu electronomicroscopic. Idem.
- GAVRILĂ, L., I. DĂBALĂ — 1975 — Genetica diviziunii celulare. Ed. Dacia. Cluj (Lucrarea a primit premiul „Emil Racoviță” al Academiei R.S.R. în anul 1977).
- GAVRILĂ, L., FL. TACINĂ — 1978 — The Fine Structure of Cyanophyccean Genophore. XIVth International Congress on Genetics. Moscow, 20—31 august.
- GILBERT, W. & DRESSLER, D. — 1969 — DNA replication : the Rolling Circle Model. Cod Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33: 473—484.
- GIOSAN, N., N. A. SĂULESCU — 1972 — Principii de genetică, ed. II-a. Ed. Ceres, București.
- GOODENOUGH, U. & R. P. LEVINE — 1974 — Genetics. Holt, Rinehart and Winston. Inc. New York, London, Sydney.
- GOULIAN, M. — 1971 — Biosynthesis of DNA. Ann. Rev. Biochem. 40: 855—898.
- GROBSTEIN, C. — 1977 — The Recombinant DNA Debate. Sci. American. 237, 22—33.
- GURDON, J. B. — 1973 — Gene Expression during Cell Differentiation. Oxford Biol. Redd. Oxford Univ. Press, 1—16.
- HILDEMAN, Y. H. — 1970 — Immunogenetics. San Francisco. Holden Day.
- HIRAIZUMI, Y. — 1971 — Spontaneous Recombination in *Drosophila melanogaster* males. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68: 268—270.
- INGRAM, V. M. — 1957 — Gene Mutation in Normal Haemoglobin: the Chemical Difference Between Normal and Sickle Cell Haemoglobin. Nature. 180: 326—328.
- JACOB, FR. — 1972 — Logica viului. București. Ed. Politică.
- JACOB, F. & E. L. WOLLMAN — 1961 — Sexuality and the Genetics of Bacteria. New York. Academic Press.

- PAUL, J., R. S. GILMOUR, I. A. R. MORE, A. J. MacGILLIVRAY & D. RICKWOOD — 1973 — Gene Masking in Cell Differentiaion: the Role Transcription of Non-Histone Chromosomal Proteins (in:), Regulation of Transcription and Translation in Eucaryotes (ed.) E. K. F. Bautz, P. Karlson & H. Kernston. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 31—38.
- PAULING, L., H. A. ITANO, S. J. SINGER & I. C. WELLS — 1949 — Sickle Cell Anaemia: a Molecular Disease. *Science*, N. Y., 110, 543—548.
- POPA, M. — 1979 — Acizii nucleici. Ed. St. și Encicl., București.
- POZSGI, N., GR. GHYKA — 1974 — Imunogenetica. Ed. Acad., R.S.R., București.
- PTASHNE, M. — 1967 — Isolation of the Phage Repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 306—313.
- RAICU, P. — 1978 — Genele și ingineria genetică. Ed. St. și Encicl., București.
- RICHARDSON, C. C. — 1969 — Enzymes in DNA metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* 38: 795—840.
- RICHARDSON, J. P. — 1969 — RNA Polymerase and the Control of RNA Synthesis. *Progr. Nucl. Acid. Res.* 9: 75—116.
- ROBERTS, R. J. — 1978 — Restriction Endonucleases: a New Role in Vivo? *Nature* 271, 502.
- SAGER, R. — 1972 — Cytoplasmic Genes and Organelles. Academic Press. New York & London.
- SINSHEIMER, R. L. — 1959 — A Single-Stranded Deoxyribonucleic Acid from Bacteriophage ϕ X 174. *J. Mol. Biol.* 1: 43—53.
- SHAPIRO, J., L. MACHATTIE, L. ERON, G. IHLER, K. IPPEN & J. BECKWITH — 1969 — Isolation of Pure Lac Operon DNA. *Nature* 224: 768—774.
- SKALKA, A. M. — 1977 — DNA Replication Bacteriophage Lambda. Current Topics in Microbiology and Immunology. 78, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 201—237.
- SNELL, G. D., J. DAUSSET, S. NATHENSON — 1976 — Histocompatibility. Acad. Press, New York, San Francisco, London.
- SOKATCH, J. R. & J. J. FERRETTI — 1976 — Basic Bacteriology and Genetics. Year Book Medical Publishers. Inc. Chicago.
- STEBBINS, G. J. Jr. — 1971 — Chromosome Evolution in Higher Plants. Arnold. London.
- STEIN, G. S., J. S. STEIN & L. J. KLEINSMITH — 1975 — Chromosomal Proteins and Gene Regulation. *Sc. American*, 232, 2.
- STERN, H. & Y. HOTTA — 1969 — Biochemistry of Meiosis (in:) Handbook of Cytology (ed. A. Lima-de-Faria) Amsterdam, North Holland.
- STREISINGER, G., Y. OKADA, J. EMRICH, J. NEWTON, A. TSUGTTA, E. TERZAGHI & M. INOUE — 1966 — Frameshift Mutations and the Genetic Code. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31:77—84.
- STRICKBERGER, M. W. — 1976 — Genetics, 2nd edition. MacMillan Publ. Co. Inc. New York, Collier MacMillan Publ., London.
- SUGINO, A., S. HIROSE & R. OKAZAKI — 1972 — RNA Linked Nascent RNA Fragments in *E. coli*. *Proc. Nat. Sci. U.S.A.* 69, 2691—2695.
- SUZUKI, D. T. & A. J. GRIFFITHS — 1976 — An Introduction to Genetic Analysis. W. H. Freeman & Co., San Francisco.
- SZEKELY, — 1978 — Triple Overlapping Genes. *Nature*, 272, 492.

- JONHNS, E. W. & T. A. HOARE — 1970 — Histones and Gene Control. *Nature* 226, 650—651.
- JUKES, T. H. — 1966 — *Molecules and Evolution*. Columbia Univ. Press. New York.
- JUKES, TH. H. — 1977 — How Many Anticodons? *Science* 198, 319.
- KHORANA, H. G. — 1968 — Polynucleotide Synthesis and the Genetic code. Harvey lect. 62, 79—105.
- KORNBERG, A. — 1974 — *DNA Synthesis*. W. H. Freeman & Co. San Francisco.
- LAMBERT, P. — 1976 — Engineering génétique: des bactéries aux mammifères. *La Recherche*, 7, 68, 571—573.
- LANGLEY, C. H. & W. M. FITCH — 1974 — An Examination of the Constancy of the Rate of Molecular Evolution. *J. Mol. Evol.* 3, 161—177. LARMAT.
- LEGATOR, M. S. & Y. G. FLAMM — 1973 — Environmental Mutagenesis and Repair. *Ann. Rev. Biochem.* 42, 683—708.
- LEDER, PH., HONJO, D. SWAN — 1977 — The Origin of Diversity of Immunoglobulin Genes (in:) *The Organization and Expression of the Eukaryotic Genome* (ed. Brandbury & Javaherian). Acad. Press, London, New York, San Francisco, 421—436.
- LEVINE, L. — 1973 — *Biology of the Gene*, 2nd ed. Saint Louis. The C. V. Mosby. Comp.
- LEWIS, K. R. & B. JOHN — 1970 — *The Organization of Heredity*. Edward Arnold (Publishers). Ltd. London.
- LIMA-de-FARIA, A. — 1975 — The Relation Between Chromomeres, Replicons, Operons, Transcription Units, Genes, Viruses and Palindromes. *Hereditas*, 81, 249—284.
- LYON, M. F. — 1971 — Possible Mechanisms of X-chromosome Inactivation. *Nature New Biol.* 232, 229—232.
- MESELSON, M. & F. STAHL — 1958 — The Replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 46, 671—682.
- MAXIMILIAN, C. — 1978 — *Aventura geneticii*. Ed. Albatros, București.
- MIHĂESCU, GR. și L. GAVRILĂ — 1981 — Ribosomal Gene Amplification in Human Cells Infected with Adenovirus. *Revue Roumaine de Biologie, Serie de Zoologie*.
- MILLER, O. L., Jr. & B. R. BEATTY — 1969 — Visualization of Nuclear Genes. *Science*. 164: 955—957.
- MILLER, O. L., Jr., B. R. BEATTY, B. A. HAMKALO & C. A. THOMAS, Jr. — 1970 — Electron Microscopic Visualization of Transcription. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35: 505—512.
- NAGL, W. — 1975 — Replication: Organization and Replication of the Eucariotic Chromosome. *Progress in Botany*. Springer Verlag, 37, 186—210.
- NAGL, W. — 1976 — Nuclear Organization. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27, 39—69.
- NAGL, W. — 1977 — Replication: Organization and Replication of the Eucariotic Chromosome. *Progress in Botany*. Springer Verlag, 39, 132—146.
- NOMURA, N. — 1969 — Ribosomes. *Scient. Am.* 221, 28—35, April.
- NOMURA, M. — 1970 — Bacterial Ribosome. *Bact. Rev.* 34: 228—277.
- PANFIL, C. — 1980 — *Întrebări și răspunsuri din Genetică*. Ed. Dacia. Cluj-Napoca.

- TAYLOR, J. H., P. S. WOODS & W. L. HUGHES — 1957 — The Organization and Duplication of Chromosomes as Revealed by Autoradiographic Studies Using Tritium-Labeled Thymidine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 43:122—128.
- TEMIN, H. M. & S. MIZUTANI — 1970 — RNA Dependent DNA Polymerase in Vicious of Rous Sarcoma Virus. *Nature* 226:1211—1213.
- THOMAS, C. A. Jr. — 1971 — The Genetic Organization of Chromosomes. *Ann. Rev. Genetics.* 5:237—256.
- TIOLLAIS, P., A. RAMBACH — 1977 — Génie génétique ou manipulations génétiques? *La Recherche* 82, 8, 821—382.
- TROCHERIS, I. — 1978 — La forme du chromosome: une question de protéines. *La Recherche*, 9, 376—377.
- WATSON, J. D. & F. H. C. CRICK — 1953a — Molecular Structure of Nucleic Acid. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171, 4 356, 737—738.
- WATSON, J. D. & F. H. C. CRICK — 1953a — Genetical Implication of the Structure of Deoxyribonucleic Acids. *Nature*, 171, 4361, 964—967.
- WATSON J. D. — 1970 — Molecular Biology of the Gene, W. A. Benjamin. Inc. New York.
- WESTERGAARD, M. & D. von WETTSTEIN — 1972 — The Synaptonemal Complex. *Ann. Rev. Genetic.* 6:74—110.
- WHITE, M. J. D. — 1973 — Animal Cytology and Evolution. 3rd ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- WHITEHOUSE, H. L. K. — 1973 — Towards an Understanding of the Mechanismes of Heredity, 3rd ed. St. Martin's Press., New York.
- WILLIAMSON, B. — 1978 — Split Gene Transcription. *Nature*, 272, 753.
- WOLLMAN, E. L., F. JACOB, W. HAYES — 1962 — Conjugation and Genetic Recombination in *Escherichia coli* K—12. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 21:141—162.
- YANOFSKY, G. — 1967 — Structural Relationships Between Gene and Protein. *Ann. Rev. Genetics* 1, 117—138.
- YUNIS, J. J. & W. G. YASMINEH — 1971 — Heterochromatin, Satellite DNA, and Cell Function. *Science* 174, 1200—1209.
- ZARNEA, G., VICTORIA HERLEA — 1974 — Poziția microorganismelor în lumea vie. Conceptul de virus, conceptul de bacterie. Progrese și perspective în biologie. București.
- ZARNEA, G., I. MOISA, L. POPA, I. VĂTAFU, L. GAVRILĂ — 1979 — Transferul genelor nif — Al II-lea Simpozion national de genetică, februarie 1979, Piatra-Neamț.

Redactor: ADRIAN GRĂNESCU
Tehnoredactor: CONSTANTIN RUSU

Apărut: 1981. Bun de tipar: 25.09.1981. Comanda nr. 2103
Coli de tipar: 13. Hirtia: velină 90 g/mp. Format: 61×86/16

Tiparul executat sub comanda nr. 312/1981
la Întreprinderea Poligrafică Cluj,
Municipiul Cluj-Napoca
B-dul Lenin nr. 146
Republica Socialistă România

